Nara Women's University Digital Information Repository

Title	Saccharomyces cerevisiae 由来カルボキシペプチダーゼYのV字ヘリックスに関する研究
Author(s)	牧野, 舞
Citation	奈良女子大学博士論文、博士（生活環境学）、博課　甲第557号、平成26年3月24日学位授与
Issue Date	2014-03-24
Description	
URL	http://hdl.handle.net/10935/3603
Textversion	ETD

This document is downloaded at: 2015-11-06T04:16:29Z

http://nwudir.lib.nara-w.ac.jp/dspace

博士論文

Saccharomyces cerevisiae 由来 カルボキシペプチダーゼＹのＶ字ヘリックス に関する研究

2014

奈良女子大学大学院 人間文化研究科 博士後期課程
共生自然科学専攻 食物栄養科学講座

牧野　舞

目次

第 1 章　序論 5

1.1. CPY の成熟化 5

1.2. CPY の立体構造 6

1.3. CPY の触媒作用及び基質認識 7

1.4. V 字ヘリックス 8

1.5. 本研究の目的 8

第 2 章　カルボキシペプチダーゼ Y(CPY)の発現系の構築 13

2.1. 緒論 13

2.2. 実験材料及び実験方法 14

2.2.1. 実験材料 14

2.2.2. 実験方法 15

2.2.2.1. 全長型 CPY の遺伝子の増幅 15

2.2.2.2. 大腸菌発現用ベクターの作製 15

2.2.2.3. 大腸菌を用いた組換え体 CPY の発現・精製 16

2.2.2.4. 酵母発現用ベクターの作製 17

2.2.2.5. 酵母を用いた組換え体 CPY の発現・精製 18

2.2.2.6. 様々なシグナルペプチドにスワッピングした CPY の酵母発現ベクターの作製 19

2.2.2.7. 様々なシグナルペプチドにスワッピングさせた CPY の酵母を用いた発現 20
2.2.2.8. タンパク質定量 21
2.2.2.9. SDS-PAGE 及び Western blotting 21
2.2.2.10. アニリダーゼ活性測定 22
2.3. 結果 23
2.3.1. 大腸菌を宿主とした組換え体 CPY の発現・精製 23
2.3.2. 酵母を宿主とした組換え体 CPY の発現・精製 23
2.3.3. 様々なシグナルペプチドにスワッピングさせた CPY の酵母を用いた発現 24
2.4. 考察 26
第 3 章　ジスルフィド結合の破壊が CPY の構造安定性及び酵素活性に及ぼす影響 40
3.1. 緒論 40
3.2. 実験材料及び実験方法 41
3.2.1. 実験材料 41
3.2.2. 実験方法 42
3.2.2.1. 変異体 CPY (C193A，C207A，C262A，C268A)の作製 42
3.2.2.2. タンパク質定量 43
3.2.2.3. SDS-PAGE 及び Western blotting 43

3.2.2.4. 酵素活性測定 43
3.2.2.5. 分子モデリングソフトウェアを用いた構造安定性の評価 44
3.3. 結果 46
3.3.1. 蝶番様ジスルフィド結合を形成する Cys の Ala 置換体の発現・精製 46
3.3.2. C262A 及び C268A の酵素活性 46
3.3.3. 各変異体の構造安定性 47
3.4. 考察 48
第 4 章　V 字ヘリックスの先端付近のアミノ酸置換が立体構造及び基質特異性に及ぼす影響 54
4.1. 緒論 54
4.2. 実験材料及び実験方法 56
4.2.1. 実験材料 56
4.2.2. 実験方法 57
4.2.2.1. 分子モデリングソフトウェアを用いた変異導入箇所の検討 57
4.2.2.2. Cys 置換体の作製 57
4.2.2.3. Tyr225 及び Pro315 の置換体の作製 58
4.2.2.4. タンパク質定量 59
4.2.2.5. SDS-PAGE 及び Western blotting 59
4.2.2.6. 酵素活性の測定 59
4.2.2.7. P315G に対する酵素反応速度論的解析 60

4.3. 結果 61

4.3.1. 分子モデリングソフトウェアを用いた変異導入箇所の検討 61

4.3.2. Cys 置換体の発現・精製及び酵素活性 61

4.3.3. Q228C 及び K314C の酵素活性 62

4.3.4. Tyr225 及び Pro315 のアミノ酸置換の影響 62

4.3.5. P315S 及び P315G の酵素活性 63

4.3.6. P315G の酵素反応速度論的解析 63

4.4. 考察 65

第 5 章　総括 75

参考文献 76

研究業績 85

謝辞 89

第 1 章　序論

カルボキシペプチダーゼ Y(CPY)は，酵母 *Saccharomyces cerevieiae* の液胞に局在するセリンプロテアーゼであり，ペプチドやタンパク質の C 末端からすべての L-アミノ酸を遊離させるエキソペプチダーゼである(1). 1960 年代に Hayashi らによって発見されて以来，モデルタンパク質として多岐にわたり研究対象となっている.

1.1. CPY の成熟化

CPY は不活性型の pre-pro-前駆体として合成され，小胞体からゴルジ体を経由し液胞へ輸送されて活性化される(Fig. 1-1). *Prc1* 配列によりコードされる全長型 CPY の一次構造は，N 末端から順に，アミノ酸 20 残基から成るシグナルペプチド領域，91 残基から成るプロペプチド領域，そして 421 残基から成る成熟領域で構成されている. リボソームで合成された全長型 CPY は，まず小胞体へ輸送され，シグナルペプチダーゼによるシグナルペプチドのプロセシング，フォールディング，そしてコアグリコシル化が起こり，67 kDa の p1-CPY と呼ばれる前駆体となる(2-4). 細胞質中が還元的であるのに対し，小胞体内腔は酸化的な環境であるため，ジスルフィド結合はここで形成され，正しいフォールディングが行われると思われる. *In vitro* 及び *in vivo* の研究から，プロペプチドを欠いた変異体 CPY は小胞体に蓄積されるものの正確にフォールディングされ，プロペプチド領域の C 末端部位が *in vivo* でのフォールディングに必須であることが判明した(5). また，変性状態からのリフォールディングを検討した研究では，

前駆体 CPY からは 50%が 5 分以内にリフォールディングされたのに対し，成熟領域のみからでは再生されないことが示され，プロペプチド領域が分子内シャペロンとして機能することが示唆された(6). 次にゴルジ体内において，さらにグリコシル化され，69 kDa の p2-CPY となり，最終的に液胞へ輸送される(7). この液胞への輸送において，プロペプチド領域の N 末端付近に位置するアミノ酸配列(Gln24-Arg-Pro-Leu27)が sorting signal として機能する(8,9). 液胞内の pH は，*vma* 遺伝子にコードされる H^+-ATPase によって 6.2 に維持されているが(10), この酸性環境により proteinase A(PrA)や proteinase B(PrB)などの液胞プロテアーゼは活性を示すようになる. 活性化したこれらの液胞プロテアーゼにより p2-CPY のプロペプチド領域が切断除去され，CPY は 61 kDa の活性型である成熟体となる(11).

1.2. CPY の立体構造

成熟体 CPY の立体構造は 1994 年に X 線結晶構造解析により決定された(Fig. 1-2)(12). 二次構造はαヘリックスを 34%，βシートを 15%含み，フォールディングパターンはα/β hydrolase グループに分類される. この fold family には，小麦由来セリンカルボキシペプチダーゼ II(CPWII)や *Geotrichum candidum* 由来リパーゼなど幅広い加水分解酵素が含まれる(13-15).

CPY は糖タンパク質であり，4 箇所(Asn13, Asn87, Asn168, Asn368)で N-結合型糖鎖修飾を受ける. CPY の細胞内輸送に糖鎖が関与することが示唆されているほか, ストレス環境下での立体構造維持の役割を担うが,

糖鎖の有無は酵素活性に影響しないものと思われる(9,16,17).

1.3. CPY の触媒作用及び基質認識

CPY はペプチドやタンパク質以外にも，エステルやアミド，アニリドに対しても触媒活性を示す(1,18-20). DFP，PMSF，ZPCK などの典型的なセリンプロテアーゼ阻害剤により活性が阻害され，一方で EDTA の影響は受けない(21).活性中心ポケットの内部に catalytic triad(Ser146, His397, Asp338)をもち(12,22-24)，Ser146 による基質への求核攻撃に始まるアシル化及び中間体の加水分解による脱アシル化の二段階の反応により基質のペプチド結合を切断する.

また，活性中心ポケットの近傍において，基質の C 末端カルボキシル基を認識する hydrogen bond network 及び基質結合部位 S_1’，S_1 サブサイトが同定されている(12). Hydrogen bond network は S_1’サブサイトの底部に位置しており，基質のカルボキシル基が Gly52 の主鎖のアミド基及び Asn51 と Glu145 の側鎖と水素結合を形成することにより基質の C 末端を認識する(25). S_1’及び S_1 サブサイトはそれぞれ基質のアミノ酸の P_1’及び P_1 部位の側鎖を認識する. S_1’サブサイトは主に疎水性残基(Thr60, Phe64, Tyr256, Tyr269, Leu272, Met398)で構成されており，このサブサイトは親水性・疎水性アミノ酸に加え，アルコール，アミド，アニリドなどを認識し広い基質選択性を示す(26). 一方，S_1 サブサイトは主に親水性残基(Tyr147, Leu178, Tyr185, Tyr188, Trp312, Ile340, Cys341)から成り，基質の P_1 部位の選択性を決定づけている(27-30). 構成成分である Cys341 は分子内で唯一ジスルフィド結合を形成しない Cys 残基であ

るが，酵素活性には必須ではないが触媒効率に大きな影響を及ぼすことが化学修飾などの研究から明らかとなっている(27,31-33)．基質結合部位については，酵素反応速度論的解析などからさらに S_2~S_5 サブサイトが推定されている(34-36)．

1.4. V 字ヘリックス

CPY 分子には，Ser204~Thr251 に及ぶ 2 本の α ヘリックスからなる特徴的な構造がある(12).本研究ではこの構造を V 字ヘリックスと命名した．V 字ヘリックスは CPY と同じ fold family に属する CPWII やヒト保護タンパク質／カテプシン A(PPCA)においても同様の構造がみられるが，CPY の V 字ヘリックスはより巨大なヘリックス構造から成る(Fig. 1-3)(13,37)．V 字ヘリックスは活性中心ポケットの上部に位置しており，CPY の分子内で形成されている 5 つのジスルフィド結合のうち 4 つが V 字ヘリックスに関係している．このことから，V 字ヘリックスが CPY において意味のある部位であることが予想される．

1.5. 本研究の目的

本研究では，CPY の触媒活性や立体構造維持，基質認識などにおいて V 字ヘリックスがどのような関わりをしているのかを解明することを目的とした．第 2 章では，さまざまな宿主を用いた組換え体 CPY の発現系の検討及びシグナルペプチドのスワッピングによる CPY の発現様式の検討について，第 3 章では V 字ヘリックスの上流及び下流で形成されている蝶番様ジスルフィド結合の破壊による CPY の構造安定性及び酵素活性への影

響について,そして第 4 章では V 字ヘリックスの挙動を調べるための V 字構造の先端付近のアミノ酸置換が立体構造及び基質特異性にどのような影響を及ぼすのかについて述べる.

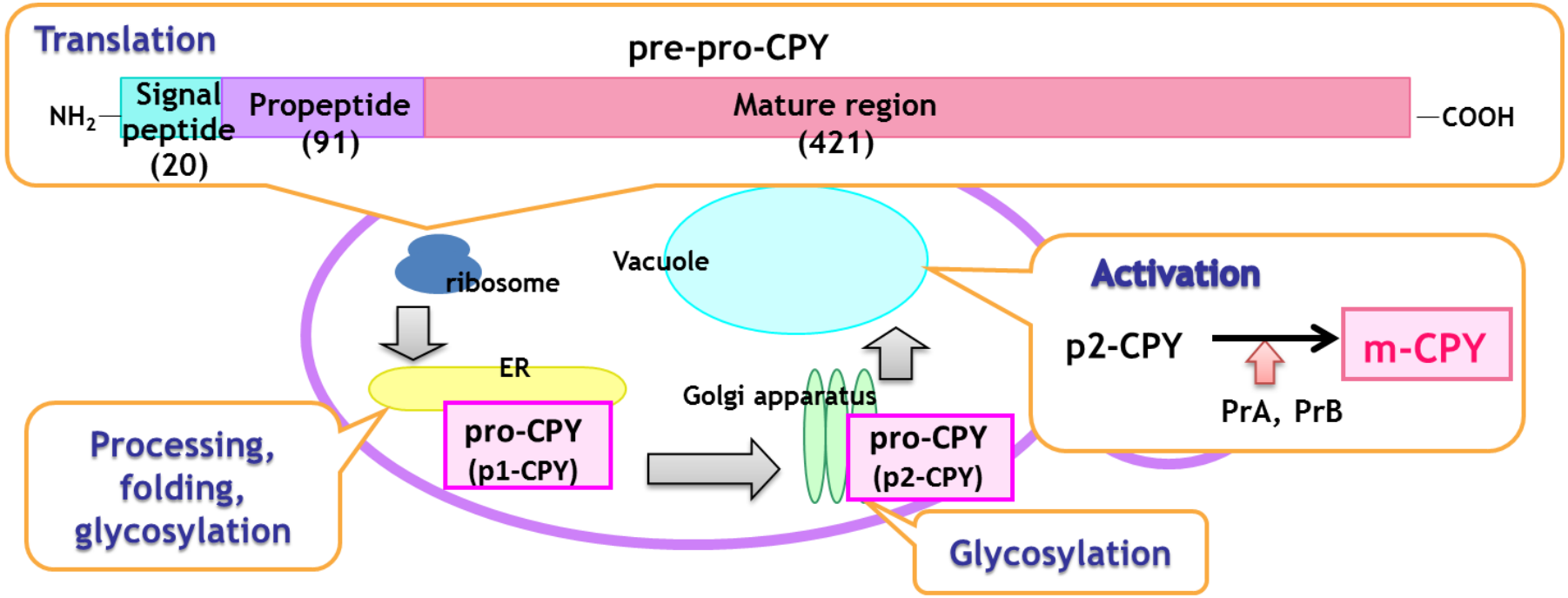


Fig. 1-1 Schematic diagram of maturation steps of CPY in yeast

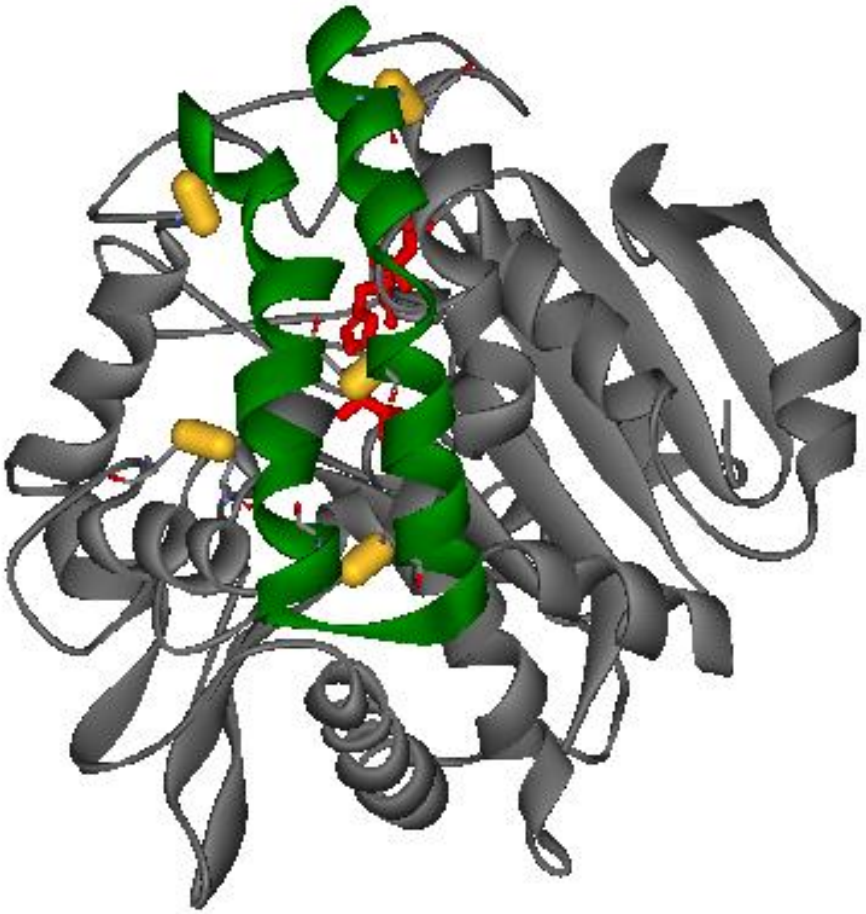


Fig. 1-2 Three dimensional structure of mature CPY determined by X-ray crystallography (PDB ID: 1YSC) (12)

V-shape helix (Ser204~Thr251) is colored in green. The catalytic triad (Ser146, His397, and Asp338) are shown in red stick. Disulfide bonds are shown in orange thick stick.

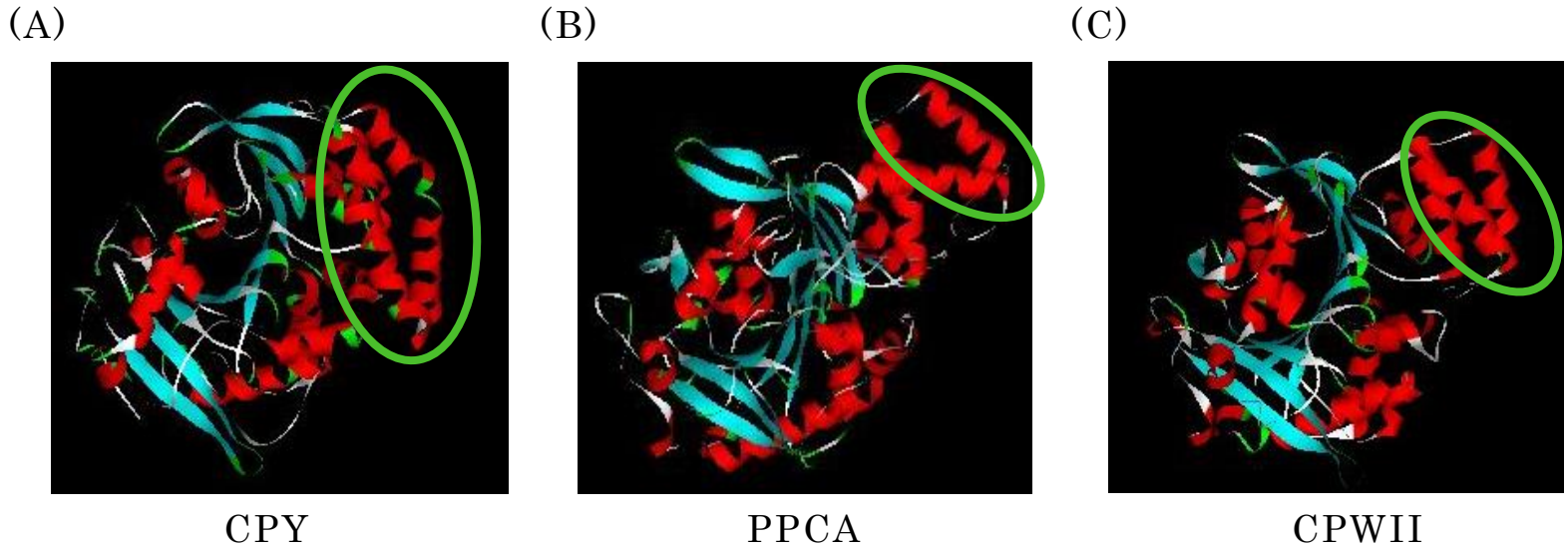


Fig. 1-3 Comparison of three serine carboxypeptidases which belong to the α/ß hydrolase fold family

Each structure was taken from Protein Data Bank (PDB). Proteins are displayed in schematic flat ribbon colored based on secondary structure. V-shape helix region is circled in green. CPY's V-shape helix consists of larger two helices than the other proteins. V-shape helices of PPCA and CPWII are positioned upward, while that of CPY hang down.

(A) CPY (1YSC; (12)), (B) PPCA (1IVY; (37)), (C) CPWII (3SC2; (13))

第 2 章　カルボキシペプチダーゼ Y(CPY)の発現系の構築

2.1. 緒論

様々な変異体 CPY を作製するために，まず，組換え体の発現系の構築を試みた．CPY が微生物由来のタンパク質であること，また，宿主の培養の簡便さから，大腸菌 *Escherichia coli* 及び酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主に用いることとした．大腸菌の発現系については，宿主由来のタンパク質の発現を抑え目的タンパク質を高発現させるため，及び精製を簡便に行うために，コールドショック発現ベクターpColdI をプラスミドベクターに用いた．酵母の発現系については，CPY，PrA，PrB をコードする遺伝子が欠損した BJ2168 株及び CPY 遺伝子のみが欠損した BY4741*prc1Δ* 株を宿主とし，新規酵母低温誘導発現ベクターpLTex321sV5H をプラスミドベクターに用いた．Sahara らによるマイクロアレイを用いた酵母の低温ストレス応答の解析から，低温で強く転写が上方制御される遺伝子が新たに多数同定された(38).本ベクターはそのうちの一つである HSP12 遺伝子のプロモーターが組み込まれており，目的タンパク質を低温で誘導発現させる．さらに，pLTex321sV5H ベクターに酵母由来の様々な分泌性タンパク質(Table 2-1)がもつシグナルペプチド配列が挿入された発現ベクター pLTex321sα2V5H，pLTex321sCPR5V5H，pLTex321sCWP2V5H，pLTex321sEUG1V5H, pLTex321sPHO89V5H に全長型 CPY のシグナルペプチドを除いた配列を挿入し,シグナルペプチドの違いによる CPY の可溶画分内の発現を検討した．

2.2. 実験材料及び実験方法

2.2.1. 実験材料

E. coli JM109 株及び BL21(DE3)株それぞれタカラバイオ社及び Novagen 社から購入し，*S. cerevisiae* BY4743 株及び BY4741*prc1*Δ 株は Thermo Fisher Scientific 社から購入し，BJ2168 株は文部科学省 NBRP「酵母」から購入した. それぞれの菌体の遺伝子型は Table 2-2 に示した. クローニングベクターpGEM-T Easy Vector は Promega 社から購入し，大腸菌発現用ベクターpColdI はタカラバイオ社から購入した. QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit は Agilent Technologies 社から購入した. Blend Taq 及び *Taq* DNA Polymerase はそれぞれ東洋紡社及び New England Biolabs 社から購入した. T4 DNA ligase はタカラバイオ社製を使用し，各種制限酵素は Roche 社，タカラバイオ社，東洋紡社製のものを使用した. アフィニティークロマトグラフィーに使用した TALON Metal Affinity Resin はタカラバイオ社から，疎水性相互作用クロマトグラフィーに使用した TOYOPEARL Butyl-650M は東ソー社から購入した. Quick Start Bradford Protein Assay Kit は Bio-Rad 社から購入した. 合成基質である N-benzoyl-L-tyrosine *p*-nitroanilide (BT*p*NA)は Sigma-Aldrich 社製を使用した. 本実験で使用したオリゴヌクレオチドプライマーは日本バイオサービス社及びオペロンバイオテクノロジー社に合成を依頼した. 各プライマーの配列は Table 2-3 に示した. その他の試薬においては，特に記載のない限り和光純薬社及びナカライテスク社の特級試薬を用いた.

2.2.2. 実験方法

2.2.2.1. 全長型 CPY の遺伝子の増幅

CPY の遺伝子及びアミノ酸配列情報は *Saccharomyces* Genome Database (http://www.yeastgenome.org/)から得た. 酢酸カリウム法により *S. cerevisiae* の実験野生株からゲノム DNA を調製した(39). このゲノム DNA をテンプレートとし, PCR 法により全長型 CPY をコードする *prc1* 遺伝子領域を増幅させた. この PCR では, DNA ポリメラーゼは Blend Taq を用い, オリゴヌクレオチドプライマーは prc1-Left-2 及び prc1-Right-3 を用いた(Table 2-3). 増幅された DNA 断片をクローニングベクター pGEM-T Easy Vector へ導入し, プラスミドベクターpGCWT を作製した. QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit を用いた部位特異的変異導入法により, *prc1* 配列の 3'末端の終止コドンの直前に His-Tag をコードする塩基配列を挿入し, プラスミドベクターpGCHWT を作製した. DNA シークエンス解析をファスマック社に依頼し, pGCHWT のインサート部位の DNA 配列を確認した.

2.2.2.2. 大腸菌発現用ベクターの作製

Prc1+Histag 配列を大腸菌コールドショック発現用ベクターpColdI へ導入するために, 2.2.2.1.で作製した pGCHWT をテンプレートとして PCR 法を用いて *prc1* 配列の上流に *Sac*I 配列, 終止コドンの下流に HindIII 配列を挿入した. オリゴヌクレオチドプライマーは SacI-prc1-F 及び prc1-HindIII-R を用いた(Table 2-3). PCR 産物はクローニングベクター

pGEM-T Easy Vector に導入し，pGCHWT2 を作製した．pGCHWT2 を制限酵素 *Sac*I 及び *Hind*III で切断したのち，アガロースゲル電気泳動にて *prc1*+Histag 配列を含むインサート部分を分離し，ゲルを切り出し Ultrafree-DA (Millipore 社製)で DNA 断片を精製した．同様に制限酵素で処理し精製した pColdI とインサート断片を T4 DNA Ligase でライゲーションし，大腸菌発現用プラスミドベクターpColdCHWT を作製した(Fig. 2-1).

2.2.2.3. 大腸菌を用いた組換え体 CPY の発現・精製

2.2.2.2.で作製した pColdCHWT を用いて，塩化カルシウム法によってコンピテントセル化された *E. coli* BL21(DE3)株を形質転換した．100 µg/ml アンピシリンを含む LB プレート培地(1% polypeptone，0.5% yeast extract，1% NaCl，2% agar)上に形成されたコロニーをランダムに選び，コロニーダイレクト PCR にてプラスミドベクターを所有する形質転換体(BLCHWT と命名)をスクリーニングした．得られた BLCHWT を 200 µg/ml アンピシリンを含む LB 液体培地内で 37 °C で振とう培養し，OD_{600}=0.4~0.6 となったところで 0.5 mM IPTG を添加し，15 °C で 14 時間培養し，目的タンパク質を誘導発現させた．菌体を回収し，等量の破砕用 buffer (50 mM sodium phosphate buffer，300 mM NaCl，pH 7.0)に懸濁させたのち Bioruptor (コスモ・バイオ製)を用いて超音波破砕(破砕 30 秒，休止 60 秒を 1 サイクルとして 10 サイクル)を行った．遠心分離により可溶画分及び不溶画分をそれぞれ回収し，不溶画分を 0.5% TritonX-100 を含む破砕用 buffer 及びミリ Q 水で洗浄した．破砕用 buffer に 8 M urea

及び 10 mM β-mercaptoethanol を添加した可溶化 buffer を不溶画分の 9 倍量加え，室温で 1 時間インキュベートし不溶画分を溶解させた．遠心分離後回収した可溶化溶液を，TALON Metal Affinity Resin を用いた His-tag アフィニティークロマトグラフィーに供した．1 ml のレジンに対して 10 倍量の平衡化／洗浄 buffer (50 mM sodium phosphate buffer, 300 mM NaCl, 8 M urea, 10 mM β-mercaptoethanol, pH 7.0)でレジンを平衡化したのち，同 buffer で 5 倍に希釈した可溶化溶液を通した．洗浄し，平衡化／洗浄 buffer に 30 mM imidazole を添加した溶出 buffer をレジンの 5 倍量流して溶出液を回収した．

2.2.2.4. 酵母発現用ベクターの作製

2.2.2.2.で作製した pColdCHWT をテンプレートとして，PCR 法を用いて *prc1* 配列の開始コドンの直前に *Sma*I サイト，終止コドンの直前に *Xho*I サイトが挿入された DNA 断片を増幅させた．オリゴヌクレオチドプライマーは SmaI-prc1-F 及び prc1-XhoI-R を用い，各配列は Table 2-2 に示した．PCR 産物はクローニングベクター pGEM-T Easy Vector に導入し，pGCHWT3 を作製した．pGCHWT3 を制限酵素 *Sma*I 及び *Xho*I で切断したのち，アガロースゲル電気泳動にて *prc1* 配列を含むインサート部分を分離し，ゲルを切り出し Ultrafree-DA で DNA 断片を精製した．同様に制限酵素で処理し精製した酵母低温誘導発現ベクター pLTex321sV5H とインサート断片を T4 DNA Ligase でライゲーションし，酵母発現用プラスミドベクター pLTCV5HGWT を作製した(Fig. 2-2).

2.2.2.5. 酵母を用いた組換え体 CPY の発現・精製

2.2.2.4.で作製した pLTCV5HGWT を用いて，酵母 BJ2168 株及び BY4741*prc1*Δ 株を酢酸リチウム法で形質転換した(40). SD(-ura)プレート培地(0.67% Yeast Nitrogen Base without Amino Acids，2% glucose，2% agar，30 µg/ml L-leucine，20 µg/ml histidine monohydrochloride monohydrate，30 µg/ml adenine hemisulfate dehydrate，20 µg/ml L-methionine)上でスクリーニングし，形質転換体 BJ2168CV5HGWT 及び BY4741*prc1*ΔCV5HGWT を得た．それぞれの形質転換体を YPD 液体培地(2% polypeptone，1% yeast extract，2% glucose)内で OD_{600}>1 になるまで 28 °C で振とう培養し，その後 0.5 M NaCl を添加し 20 °C で 3 日間培養し，目的タンパク質を誘導発現させた．

誘導培養後の BJ2168CV5HGWT は，等量の 50 mM sodium phosphate buffer, 300 mM NaCl (pH7.0)に懸濁させ，ビードビーター(和研薬社製)を用いて 0.5 mm ビーズで菌体を破砕した(破砕 30 秒，休止 1 分を 4 セット行った)．遠心分離後の上清に対して硫安分画を行い，40-70%の画分の沈殿を回収した．3 ml/g ppt の 50 mM sodium phosphate buffer, 300 mM NaCl（pH 7.0）に沈殿を再懸濁させ，His-tag アフィニティークロマトグラフィーを行った．1 ml のレジンに対して 10 倍量の平衡化／洗浄 buffer(50 mM sodium phosphate buffer, 300 mM NaCl, pH 7.0)でレジンを平衡化したのち，同 buffer でさらに 5 倍希釈したタンパク質溶液を通した．洗浄し，平衡化／洗浄 buffer に 30 mM imidazole を添加した溶出 buffer をレジンの 5 倍量流して溶出液を回収した．続いて溶出液を 5 倍量の 10 mM sodium phosphate buffer，2 M ammonium sulfate (pH 7.0)と混合し，

同 buffer で十分に平衡化させた TOYOPEARL Butyl-650M カラム(1.5 × 5 cm)に通した．10 mM sodium phosphate buffer, 0.1 M ammonium sulfate (pH 7.0)でレジンを洗い，10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)で pro-CPY を溶出させた．

誘導培養後の BY4741*prc1*ΔCV5HGWT からの CPY の精製は過去の論文の手順を参考にした(21)．回収した菌体を 0.2 ml/g wet cell のクロロホルム及び 0.4 ml/g wet cell のミリ Q 水に懸濁させ，pH 7.0 を保ち室温で 16 時間撹拌させながら自己溶菌させた．遠心分離後の上清に対して硫安分画を行い，20-90%の画分の沈殿を回収した．3 ml/g ppt の 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)で沈殿を再溶解させ，pH 5.0 を保ちながら室温で 18 時間放置させることで，pro-CPY を成熟化させた．遠心分離後の上清を 5 倍量の 10 mM sodium phosphate buffer，2 M ammonium sulfate (pH 7.0)と混合し，同 buffer で十分に平衡化させた TOYOPEARL Butyl-650M カラム(1.5 × 5 cm)に通した．10 mM sodium phosphate buffer, 0.1 M ammonium sulfate (pH 7.0)でレジンを洗い，10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)で CPY を溶出させた．溶出液は centricon YM-10 (Millipore 社製)を用いて 2 倍に濃縮させ，50 °C で 10 分間熱処理させた．遠心分離後の上清を精製酵素液とした．

2.2.2.6. 様々なシグナルペプチドにスワッピングした CPY の酵母発現ベクターの作製

全長型 CPY のコード領域のうちシグナルペプチドを欠いた DNA 断片を PCR 法にて増幅させた．2.2.2.4.で作製した pLTCV5HGWT をテンプレー

トとし，オリゴヌクレオチドプライマーSmaI-prc1(-sp)-F 及び prc1-XhoI-R を用いることで，プロペプチド領域の直前に *Sma*I サイト，終止コドンの直前に *Xho*I サイトがそれぞれ挿入されるようにした．PCR 産物はクローニングベクターpGEM-T Easy Vector に導入し，pGCHWTspΔ を作製した．pGCHWTspΔ を制限酵素 *Sma*I 及び *Xho*I で切断したのち，アガロースゲル電気泳動にて *prc1* 配列を含むインサート部分を分離し，ゲルを切り出し Ultrafree-DA で DNA 断片を精製した．同様に制限酵素で処理し精製した，酵母由来の様々なタンパク質のシグナルペプチド配列を含む酵母低温誘導発現ベクターpLTex321sα2V5H，pLTex321sCPR5V5H，pLTex321sCWP2V5H，pLTex321sEUG1V5H，pLTex321sPHO89V5H と，インサート断片を T4 DNA Ligase で各々ライゲーションし，酵母発現用プラスミドベクターpLTα2CV5HWT，pLTCPRCV5HWT，pLTCWPCV5HWT，pLTEUGCV5HWT，pLTPHOCV5HWT を作製した(Fig. 2-3)．DNA シークエンス解析をファスマック社に依頼し，プラスミドベクターのインサート部位の DNA 配列を確認した．

2.2.2.7. 様々なシグナルペプチドにスワッピングさせた CPY の酵母を用いた発現

2.2.2.6.で作製したプラスミドベクターを用い，酵母 BJ2168 株を酢酸リチウム法で形質転換した．SD(-ura)プレート培地（0.67% Yeast Nitrogen Base without Amino Acids，2% glucose，2% agar，30 µg/ml L-leucine，20 µg/ml histidine monohydrochloride monohydrate，30 µg/ml adenine hemisulfate dehydrate，20 µg/ml L-methionine)上でスクリーニングし，

形質転換体 BJα2CV5HWT，BJCPRCV5HWT，BJCWPCV5HWT，BJEUGCV5HWT，BJPHOCV5HWT を得た．形質転換体を YPD 液体培地(2% polypeptone，1% yeast extract，2% glucose)内で OD_{600}>1 になるまで 28 °C で振とう培養し，その後 0.5 M NaCl を添加し 20 °C で 3 日間培養し，目的タンパク質を誘導発現させた．誘導培養後の各細胞は，等量の 50 mM sodium phosphate buffer, 300 mM NaCl (pH7.0)に懸濁させ，ビードビーターを用いて 0.5 mm ビーズで破砕した(破砕 30 秒，休止 1 分を 4 セット行った)．遠心分離後の上清を回収し，粗酵素液とした．

2.2.2.8. タンパク質定量

溶液内のタンパク質量は，bovine serum albumin を標準タンパク質として Quick Start Bradford Protein Assay Kit を用いて定量した．実際の手順はキットの取扱説明書の記述に従った．

2.2.2.9. SDS-PAGE 及び Western blotting

各発現系において，組換え体 CPY の発現及び精製段階は SDS-PAGE 及び Western blotting により確認した．SDS を 0.1%含む 10%ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い，その後ゲルは 0.1% (w/v) CBB R-250 を含む色素液で染色した(以下，CBB 染色法と略す)．Western blotting では，SDS-PAGE 後のゲル上のタンパク質を Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad 社製)を用いて CAPS buffer (pH 11)存在下で PVDF メンブレンへ転写させた．スキムミルクにより室温で 1 時間ブロッキングさせたのち，メンブレン上のタンパク質を

各種抗体と反応させた. 宿主に BL21(DE3)株及び BJ2168 株を用いた発現系における実験内では, 抗体は Anti-His(C-term)-HRP antibody (Invitrogen 社製)を 10,000 倍希釈で用い, 宿主に BY4741*prc1*Δ 株を用いた発現系の実験では, 一次抗体に 10,000 倍希釈した Anti-CPY antiserum (本研究室保有品), 二次抗体に 100,000 倍希釈した horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (GE Healthcare 社製)を用いた. 化学発光試薬に ImmunoStar LD (和光純薬社製)を用い, 免疫陽性タンパク質を ECL Mini-camera (GE Healthcare 社製)によりインスタントフィルムに投影させた.

2.2.2.10. アニリダーゼ活性測定

精製した成熟型 CPY の酵素活性は, アニリド基質 BT*p*NA を用いて評価した(21,41). 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)内で酵素液と DMF に溶解した BT*p*NA 溶液を混合させ, U-2000A 分光光度計(日立社製)により室温で 5 分間 A_{410} をモニタリングした. 加水分解産物である *p*-nirtoaniline の生成量から組換え体 CPY のアニリダーゼ活性を算出した.

2.3. 結果

2.3.1. 大腸菌を宿主とした組換え体 CPY の発現・精製

CPY をコードする遺伝子 *prc1* 配列を挿入した大腸菌発現ベクター pColdCHWT を大腸菌 BL21(DE3)へ導入し，形質転換体 BLColdCHWT を得た．誘導培養後，菌体を超音波破砕し，可溶画分及び不溶画分に分離した．それぞれを SDS-PAGE により解析した結果，組換え体 CPY は不溶画分内に発現していることが確認された．8M で可溶化し，His-tag アフィニティークロマトグラフィーを行った結果,変性状態の組換え体 CPY が高純度で精製された(Fig. 2-4)．大腸菌内で発現させているため糖鎖修飾されておらず脱糖鎖型であり，且つ，成熟化のプロセスを受けていないため全長型の前駆体 CPY が得られた．

2.3.2. 酵母を宿主とした組換え体 CPY の発現・精製

作製した酵母発現ベクターpLTCV5HGWT を用いて酵母 BJ2168 株を形質転換し，得られた形質転換体を誘導培養した．その後，細胞をビーズ破砕し上清に対して硫安沈殿を行い 40~70%飽和の画分を回収した．TALON Metal Affinity Resin を用いた His-tag アフィニティークロマトグラフィー，続いて TOYOPEARL Butyl-650M を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィーを行い，溶出液を SDS-PAGE 及び Western blot 解析した結果，約 69 kDa の CPY の高精製が確認された(Fig. 2-5)．1 l スケールの培養から約 1 mg の CPY が回収された(Table 2-4)．CPY，PrA 及び PrB 遺伝子欠損株内で発現させたため,得られた CPY はプロ領域を保持したままの不

活性型の前駆体タンパク質であった.

次に，pLTCV5HGWT を CPY 遺伝子欠損株である BY4741*prc1*Δ 株に導入し，同様に組換え体 CPY を誘導発現させた．菌体をクロロホルムで処理することで自己溶菌させ，上清に対して硫安分画を行い 20~90%の画分を回収した．その後 pH 5.0 条件下で活性化させ，TOYOPEARL Butyl-650M を用いた疎水性相互作用クロマトグラフィーを行い，溶出液を 50 °C で 10 分間処理した．熱処理後の溶液を解析した結果，成熟体である約 61 kDa の CPY の精製が確認された(Fig. 2-6)．各精製段階のタンパク質溶液についてアニリド基質 BT*p*NA に対するアニリダーゼ活性を測定した結果，最終的に約 100 倍の精製度であった(Table 2-5)．

2.3.3. 様々なシグナルペプチドにスワッピングさせた CPY の酵母を用いた発現

シグナルペプチドを様々な種類のタンパク質のものにスワッピングした CPY を酵母 BJ2168 株内で誘導発現させ，ビーズ破砕後の上清を Western blotting により解析した．その結果，MFα2，CPR5，EUG1，PHO89 シグナルペプチドについてはオリジナルと同様にプロセシングされているのに対し，CPW2 のシグナルペプチドはプロセシングされずに残存していることが判明した(Fig. 2-7)．これは，Cwp2p が GPI アンカー型の細胞壁タンパク質であることからシグナルペプチド配列は切断されないタイプのものであるからであろうと思われる(42-44)．そして，いずれの CPY においても可溶性タンパク質として発現していることから，シグナルペプチドの残存に関わらずプロ領域内の分子内シャペロンにより正しくフォールディン

グが行われることが示唆された.

2.4. 考察

序論で述べたように，CPY は酵母内において，リボソームで翻訳された状態の全長型構造から，小胞体での p1-CPY，ゴルジ体での p2-CPY の前駆体構造を経て，最終目的地である液胞内で活性型の成熟体構造となり，様々な形態の構造をとっている.それぞれの状態の CPY 分子の研究を行うためには，それぞれの組換え体タンパク質を大量に作製する必要がある.

大腸菌を宿主に用いた場合，糖鎖修飾は行われず，さらにプロセシングされないため脱糖鎖状態の全長型 CPY が得られる.糖タンパク質を結晶化させるとき，糖鎖を除くことで結晶化されやすくなることから酵素による脱糖鎖処理を行うことがあるが，本発現系ではその工程を省略することができ，さらに結果に示したように十分な発現量が得られるため，全長型 CPY の結晶化に適している．本研究では変性状態での全長型 CPY が得られたが，CPY は分子内シャペロンをプロ領域に有しているため，*in virto* でのリフォールディングが可能である(6)．再生条件が最適化できれば，本発現系を用いて立体構造を形成した全長型 CPY の獲得･結晶化が期待できる.

酵母を宿主とした場合，CPY は同種タンパク質であることから可溶性タンパク質として獲得されやすくなることが予想され，本研究の結果では期待通りに可溶性タンパク質が高収量で得られることが示された．BJ2168 株内で発現させると CPY はプロ領域の切断除去が行われないため,成熟化前の p1-CPY もしくは p2-CPY が得られた.前駆体 CPY は不安定であるため未だ結晶構造が解かれていない．しかし，本研究での発現系では前駆体

CPY が安定的に高精製されるため，結晶化に用いることができると考える．一方，BY4741*prc1*Δ 株を宿主とした系では，CPY の成熟化に関与するプロテアーゼ群が存在しているため，従来の精製法を用いることにより活性型 CPY が高精製された．変異導入による酵素活性の影響など酵素学的研究においては活性型酵素が必要であるため，本発現系は有用であると思われる．

シグナルペプチドは，分泌性タンパク質を細胞質から小胞体やミトコンドリアなどの最終目的地へ確実に輸送させる重要な断片である(45)．CPY は細胞質外でフォールディングが行われるため，輸送力の高いシグナルペプチドを用いることで組換え体 CPY を可溶性タンパク質として高発現させることが可能となると思われる．今回の実験で用いたシグナルペプチドの由来タンパク質はいずれも局在性の高いものであり，実際に組換え体 CPY は高発現したことからその実用性が示された．一方，興味深いことに，CPY のオリジナルのシグナルペプチドでも組換え体 CPY は高発現しており，CPY 由来のシグナルペプチドも同様に組換え体の可溶性タンパク質の発現系に利用可能であると言えるかもしれない．

以上のように，本章で構築した発現系はそれぞれさまざまな形態の CPY を得ることができるため，結晶化や変異体タンパク質作製など多様な CPY 分子の研究への貢献が期待される．

Table 2-1 Descriptions of derived proteins of each signal peptide contained expression vectors

Information of each protein was cited by *Saccharomyces* Genome Database (http://www.yeastgenome.org/).

Signal peptides	Derived proteins	Amount of amino acid residue
MFα2	Mating pheromone alpha-factor made by alpha cells	89
CPR5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (cyclophilin) of the endoplasmic reticulum	50
CWP2	Covalently linked cell wall mannoprotein	71
EUG1	Protein disulfide isomerase of the endoplasmic reticulum lumen	50
PHO89	Na^+/Pi cotransporter	41

Table 2-2 *E. coli* and *S. cerevisiae* strains used in this study

Strain	Genotype	Sourse
E. coli		
JM109	*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(r_K^- m_K^+), *e14*$^-$ (*mcrA*$^-$), *supE44*, *relA1*, Δ(*lac-proAB*)/F' [*traD36*, *proAB*$^+$, *lac I*^{q}, *lacZ*ΔM15]	Takara Bio
BL21(DE3)	F$^-$, *ompT*, *hsdS*$_B$(r_B^- m_B^-), *gal*(λcI 857, *ind*1, *Sam*7, *nin*5, *lacUV*5-T7*gene*1), *dcm*(DE3)	Novagen
S. cerevisiae		
BJ2168	*MATa, prb1-1122, prc1-407, pep4-3, ura3-52, leu2, trp1*	NBRP
BY4741*prc1Δ*	*MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, prc1Δ::kanMX4*	Thermo Fisher Scientific

Table 2-3 Oligonucleotide primers using for preparation of *prc1* fragment, construction of each plasmid vectors of wild-type CPY, and insertion of His-tag encoding fragment

Primers	Sequences
prc1-Left-2	5'-TTCTTTTCGTCTTCCCTCCT-3'
prc1-Right-3	5'-CGTATATATTTCGATCGTAGCTGAT-3'
prc1-HistagQC4-F	5'-CCACGGTGGTTTCTCCTTACATCATCATC ATCATCATTAAAGCGTGTATGTGTAGGC-3'
prc1-HistagQC4-R	5'-GCCTACACATACACGCTTTAATGATGATG ATGATGATGTAAGGAGAAACCACCGTGG-3'
SacI-prc1-F	5'-TACGACGAGCTCATGAAAGCATTC -3'
prc1-HindIII-R	5'-GCAGACCAAGCTTTTAATGATGATG-3'
SmaI-prc1-F	5'-ACACCCGGGATGAAAGCATTC-3'
prc1-XhoI-R	5'-ACGCTCGAGTAAGGAGAAACC-3'
SmaI-prc1(-sp)-F	5'-CACCCGGGATCTCATTGCAAAG-3'

Primer pair, prc1-Left-2 and prc1-Right-3, was used for amplifying *prc1* fragment. His-tag encoding fragment was inserted into the 3'- termini of *prc1* by site-directed mutagenesis using prc1-HistagQC4-F and prc1-HistagQC4-R primers. His-tag region is shown with a gray background. Primer pair, SacI-prc1-F and prc1-HindIII-R, was used for introduction of restriction sites to the 5'- and 3'- termini of *prc1*+Histag fragment. *Sac*I restriction site and *Hind*III restriction site are underlined. Primer pair, SmaI-prc1-F and prc1-XhoI-R, was used for introduction of restriction sites to the 5'- and 3'- termini of *prc1* fragment. *Sma*I restriction site and *Xho*I restriction site are underlined. SmaI-prc1(-sp)-F and prc1-XhoI-R primers were used for introduction of restriction sites to the 5'- and 3'- termini of signal peptide region deleted *prc1* fragment. *Sma*I restriction site and *Xho*I restriction site are underlined.

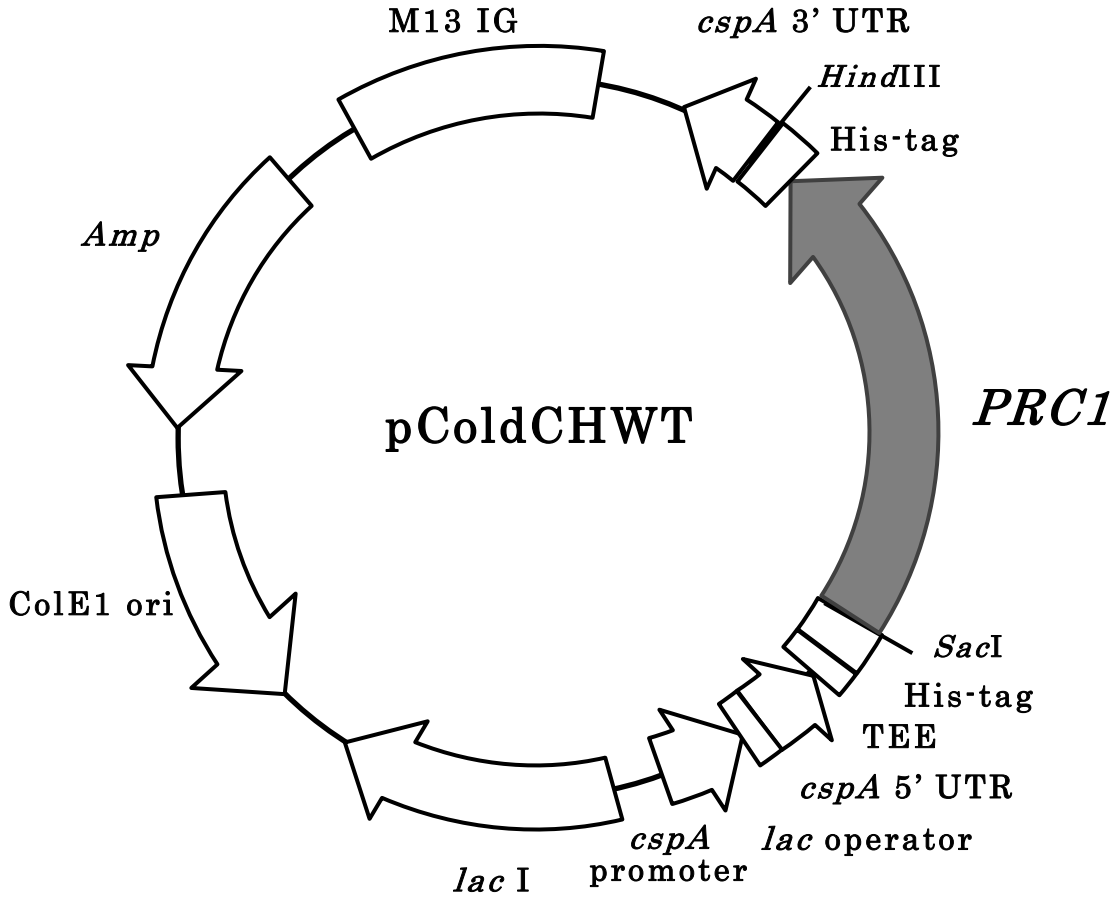


Fig. 2-1 Schematic diagram of the constructed plasmid vector pColdCHWT

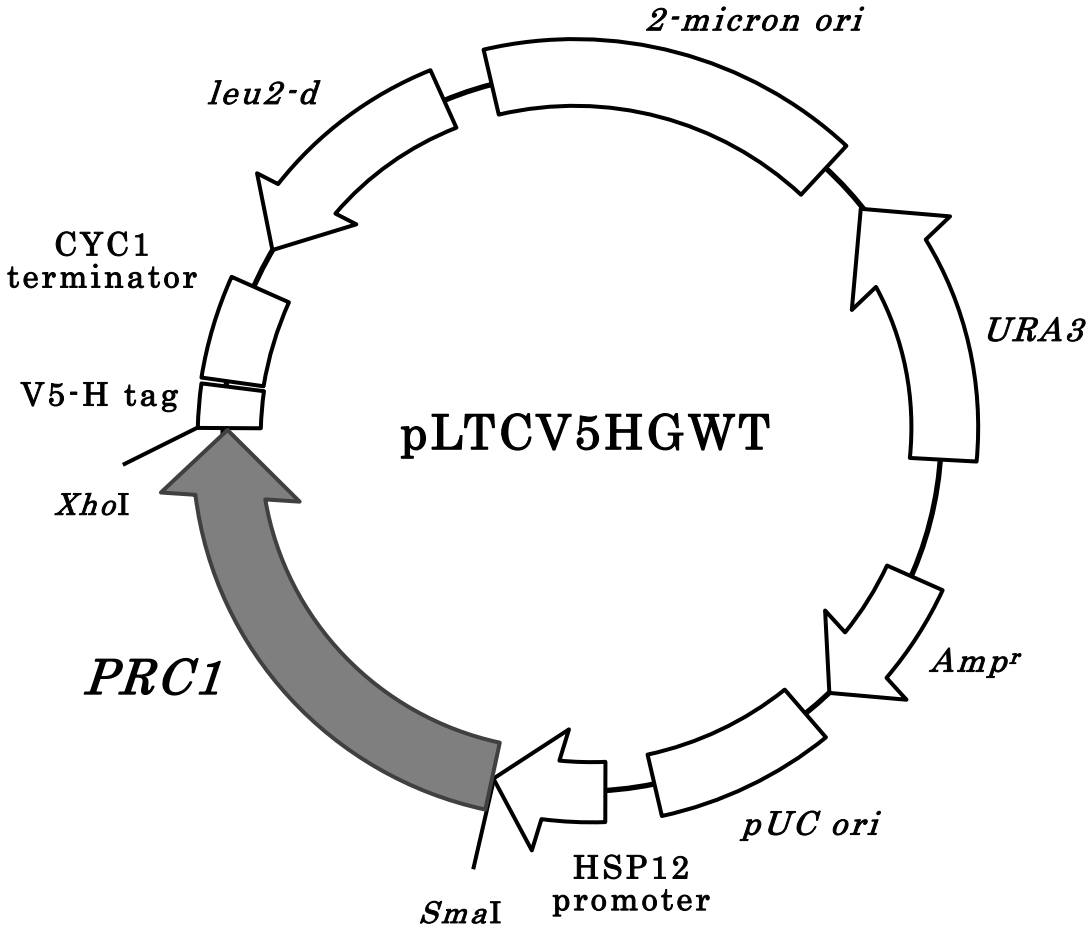


Fig. 2-2 Schematic diagram of the constructed plasmid vector pLTCV5HGWT

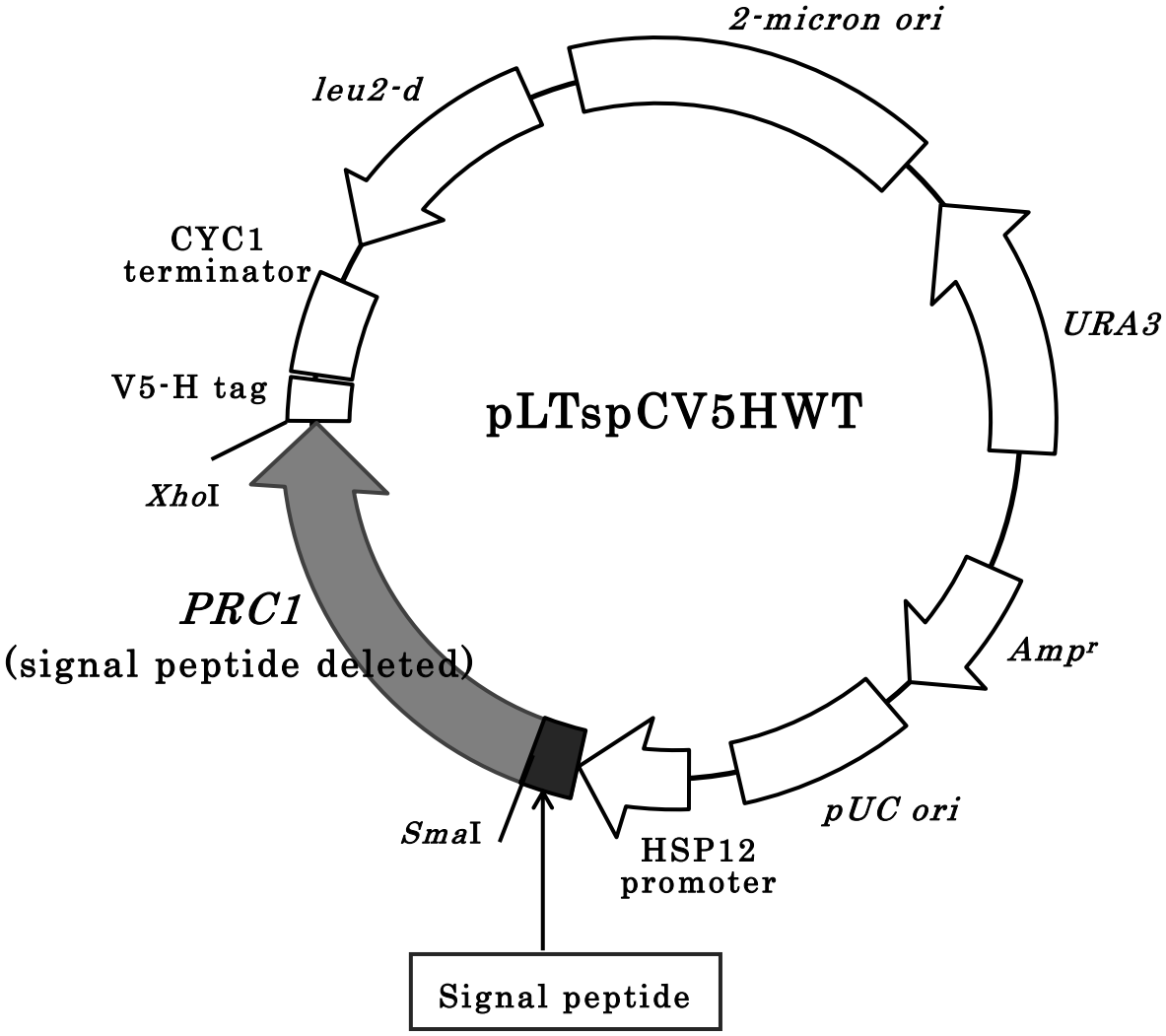


Fig. 2-3 Schematic diagram of the constructed plasmid vector of signal peptide replaced wild-type CPY

Each signal peptide fragment is inserted downstream of HSP12 promoter region in each template vector. Original signal peptide deleted *prc1* fragment was introduced downstream of each signal peptide region.

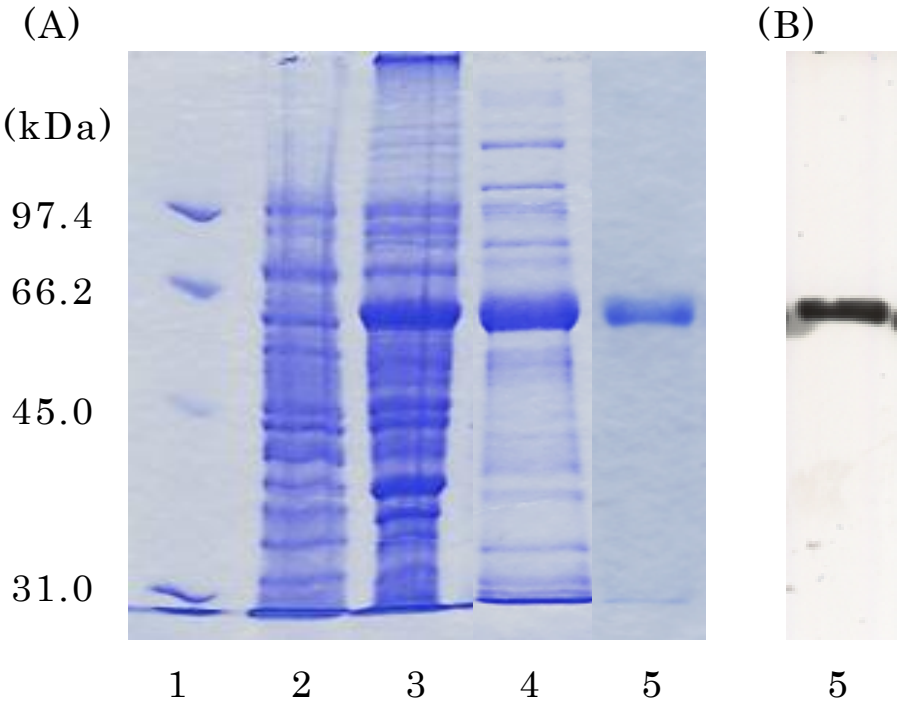


Fig. 2-4 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) of recombinant full-length wild-type CPY at purification steps

E. coli cells in which recombinant full-length WT is expressed were disrupted by sonication and the precipitates were solubilized with 8 M urea for 1 h at 25 °C. Denatured WT was purified by His-tag affinity chromatography on TALON Metal Affinity Resin. In Western blotting, Anti-His (C-term)-HRP antibody (1:10,000) was used.

(A) (B) Lane 1, molecular marker; lane 2, supernatant after sonication; lane 3, precipitates after sonication; lane 4, the solution after solubilization; lane 5, the eluate from TALON Metal Affinity column.

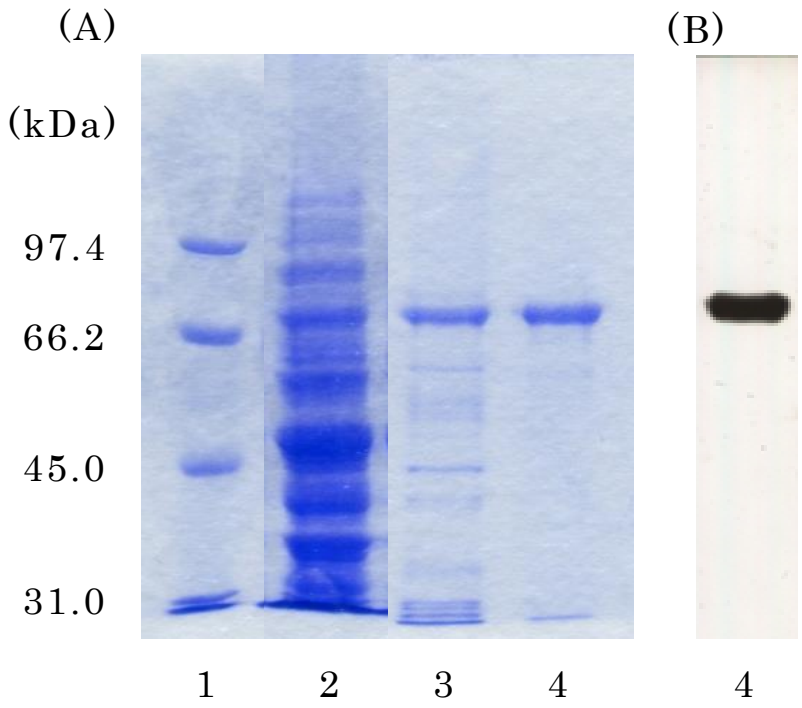


Fig. 2-5 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) of recombinant wild-type pro-CPY at purification steps

Yeast cells in which recombinant pro-CPY is expressed were disrupted using bead beater and the supernatant was corrected. After ammonium sulfate precipitation, pro-CPY was purified by His-tag affinity chromatography on TALON Metal Affinity Resin and hydrophobic interaction chromatography on TOYOPEARL Butyl-650M. In Western blotting, Anti-His (C-term)-HRP antibody (1:10,000) was used.

(A) (B) Lane 1, molecular marker; lane 2, the solution after ammonium sulfate precipitation; lane 3, the eluate from TALON Metal Affinity column; lane 4, the eluate from TOYOPEARL Butyl-650M column.

Table 2-4 Summary of purification of recombinant wild-type pro-CPY

Because pro-CPY is an inactive form, the recovery values are calculated based on the amount of total protein.

Steps	Total protein (mg)	Recovery (%)
Cell disruption	310	100
Ammonium sulfate precipitation	230	74
His-tag affinity chromatography	8.7	2.8
Hydrophobic interaction chromatography	1.2	0.39

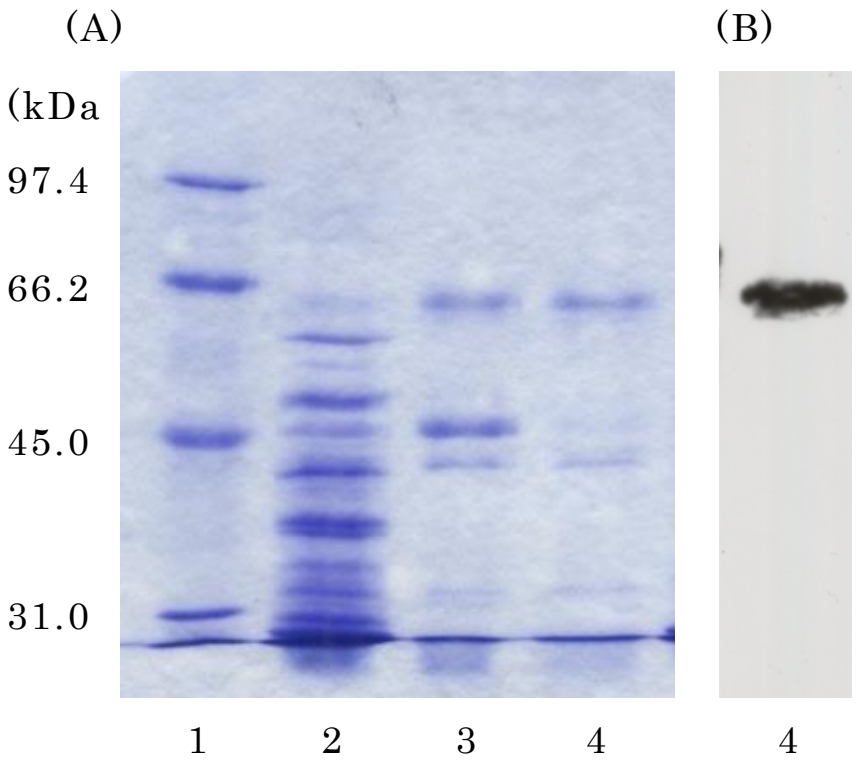


Fig. 2-6 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) of recombinant wild-type CPY at purification steps

Yeast cells in which recombinant WT is expressed were lysed by chloroform and the supernatant was treated with ammonium sulfate. Pro-CPY in the precipitates was activated at pH 5.0 and activated mature CPY was purified by hydrophobic interaction chromatography on TOYOPEARL Butyl-650M and heat treatment as described in the text. In Western blotting, rabbit polyclonal anti-CPY antiserum (1:10,000) and horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies (1:100,000) were used.

(A) (B) Lane 1, molecular marker; lane 2, the solution after activation; lane 3, the eluate from TOYOPEARL Butyl-650M column; lane 4, the supernatant after heat treatment.

Table 2-5 Summary of purification of recombinant wild-type CPY

Each parameter was calculated based on the anilidase activity toward BT*p*NA.

Steps	Total protein (mg)	Total activity (nmol/min)	Specific activity (nmol/min/mg)	Recovery (%)	Purification
Activation	70	360	5.1	100	1
Hydrophobic interaction chromatography	1.4	430	310	120	61
Heat treatment	0.64	350	550	97	110

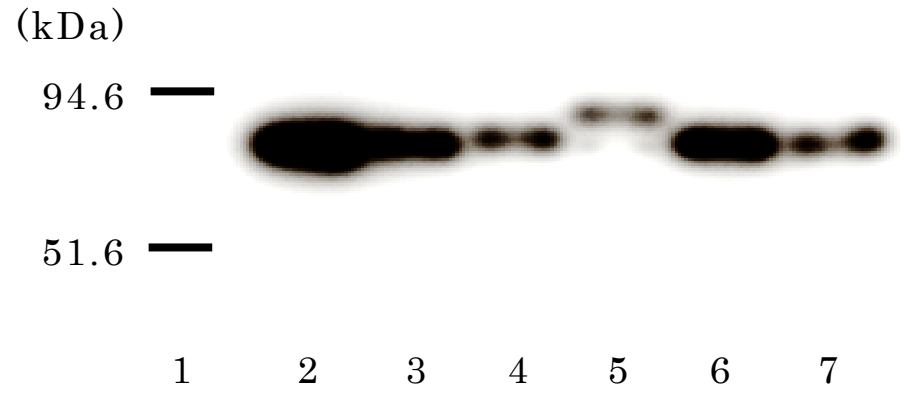


Fig. 2-7 Western blotting of precursor wild-type CPY expressed with signal peptide derived from various proteins

Yeast cells in which recombinant precursor WT is expressed were disrupted using bead beater and the supernatant was analyzed by Western blotting. Anti-His (C-term)-HRP antibody (1:10,000) (Invitrogen) was used in Western blotting.

Lane 1, molecular marker; lane 2, WT expressed with original signal peptide; lane 3, WT expressed with MFα2 signal peptide; lane 4, WT expressed with CPR5 signal peptide; lane 5, WT expressed with CWP2 signal peptide; lane 6, WT expressed with EUG1 signal peptide; lane 7, WT expressed with PHO89 signal peptide.

第 3 章　ジスルフィド結合の破壊が CPY の構造安定性及び酵素活性に及ぼす影響

3.1. 緒論

CPY の分子内にはジスルフィド結合が 5 箇所で形成されているが，そのうち 4 つが V 字ヘリックスに関係している(Fig. 3-1)(12)．2 つのジスルフィド結合，Cys193-Cys207 及び Cys262-Cys268 は，V 字ヘリックスを構成する 2 本の α ヘリックスの上流及び下流で形成されている．立体構造を検討すると，V 字ヘリックスは酵素本体から突出して位置しているが，この 2 つのジスルフィド結合が蝶番様に作用し V 字ヘリックスを安定的につないでいるように見える．一方，他の 2 つのジスルフィド結合(Cys217-Cys240 及び Cys224-Cys233)は V 字ヘリックスの 2 本の α ヘリックスを架橋するように形成されており，‘disulfide zipper’と呼ばれている(12)．以前の研究において，この 2 つの結合の破壊がタンパク質のミスフォールディングを引き起こしプロテオリシスに対する感受性が上がることが判明し，ジスルフィド結合による V 字構造の形成が立体構造維持に関与することが示唆される(46)．

そこで本章では，CPY における V 字ヘリックスの構造維持の必要性をさらに検証するために，先に述べた蝶番様ジスルフィド結合(Cys193-Cys207 及び Cys262-Cys268)を形成している各 Cys 残基を Ala に置換することで結合を破壊しその影響を調べた．

3.2. 実験材料及び実験方法

3.2.1. 実験材料

E. coli JM109 株はタカラバイオ社から購入し，*S. cerevisiae* BY4741*prc1*Δ 株は Thermo Fisher Scientific 社から購入した．それぞれの菌体の遺伝子型は Table 3-1 に示した．クローニングベクターpGEM-T Easy Vector は Promega 社から購入し，QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit は Agilent Technologies 社から購入した．Blend Taq 及び *Taq* DNA Polymerase はそれぞれ東洋紡社及び New England Biolabs 社から購入した．T4 DNA ligase はタカラバイオ社製を使用し，各種制限酵素は Roche 社，タカラバイオ社，東洋紡社製のものを使用した．疎水性相互作用クロマトグラフィーに使用した TOYOPEARL Butyl-650M は東ソー社から購入した．Quick Start Bradford Protein Assay Kit は Bio-Rad 社から購入した．合成基質である N-benzoyl-L-tyrosine *p*-nitroanilide (BT*p*NA) は Sigma-Aldrich 社製を使用し，benzyloxycarbonyl-L-phenilalanyl-L-leucine (Z-Phe-Leu-OH)は Bachem 社製を使用した．本実験で使用したオリゴヌクレオチドプライマーは日本バイオサービス社及びオペロンバイオテクノロジー社に合成を依頼した．その他の試薬においては，特に記載のない限り和光純薬社及びナカライテスク社の特級試薬を用いた．

3.2.2. 実験方法

3.2.2.1. 変異体 CPY (C193A, C207A, C262A, C268A)の作製

4 種類の変異体 CPY (C193A, C207A, C262A, C268A)の発現用ベクターの構築はそれぞれ同じ手順で行った. 第 2 章にて構築した野生型 CPY 発現用ベクターpLTCV5HGWT をテンプレートとし, 目的の変異配列を含むオリゴヌクレオチドを Forward primer に用い, PCR 法にて目的の変異配列を含む DNA 断片を増幅した. アガロースゲル電気泳動にて分離された PCR 産物は, ゲルから切り出し, 精製した. この精製した DNA 断片をメガプライマーとし, QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit を用いてテンプレートプラスミド pLTCV5HGWT から変異体 CPY 発現用ベクター, pLTCV5HGC193A, pLTCV5HGC207A, pLTCV5HGC262A, pLTCV5HGC268A をそれぞれ合成した. 作製したプラスミドベクターを BY4741*prc1*Δ 株へ酢酸リチウム法にて導入し, SD(-ura)プレート培地上で形質転換体をスクリーニングした. 形質転換体を YPD 液体培地で OD_{600}>1.0 になるまで 28 °C で振とう培養し, その後 0.5 M NaCl を添加し, 20 °C で 3 日間誘導培養した. 菌体を回収し, 0.2 ml/g wet cell のクロロホルム及び 0.4 ml/g wet cell のミリ Q 水を加え, pH 7.0 を保ち室温で 16 時間撹拌させながら自己溶菌させた. 遠心分離後の上清に対して硫安分画を行い, 20-90%の画分の沈殿を回収した. 3 ml/g ppt の 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)で沈殿を再溶解させ, pH 5.0 を保ちながら室温で 18 時間放置させることで, pro-CPY を成熟化させた. 遠心分離後の上清を 5 倍量の 10 mM sodium phosphate buffer, 2 M ammonium

sulfate (pH 7.0)と混合し，同 buffer で十分に平衡化させた TOYOPEARL Butyl-650M カラム(1.5 × 5 cm)に通した. 10 mM sodium phosphate buffer, 0.1 M ammonium sulfate (pH 7.0)でレジンを洗い，10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)で CPY を溶出させた．溶出液は centricon YM-10 を用いて 2 倍に濃縮させ，50 °C で 10 分間熱処理させた．遠心分離後の上清を精製酵素液とした.

3.2.2.2. タンパク質定量

溶液内のタンパク質量は，bovine serum albumin を標準タンパク質として Quick Start Bradford Protein Assay Kit を用いて定量した．実際の手順はキットの取扱説明書の記述に従った.

3.2.2.3. SDS-PAGE 及び Western blotting

変異体 CPY の発現及び精製段階は SDS-PAGE 及び Western blotting により確認した．実際の手順は 2.2.2.9.に記載の通りである．抗体には，一次抗体に 10,000 倍希釈した Anti-CPY antiserum (本研究室保有品)，二次抗体に 100,000 倍希釈した horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (Invitrogen 社製)を用いた．化学発光試薬は ImmunoStar LD（和光純薬社製）を用いた.

3.2.2.4. 酵素活性測定

各変異体 CPY に対して,ペプチダーゼ活性及びアニリダーゼ活性を測定した．ペプチダーゼ活性はペプチド基質 Z-Phe-Leu-OH に対する加水分解

活性から評価した．10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)内で精製酵素 3~4 μg/ml を 1 mM の Z-Phe-Leu-OH と混合させ,室温で 5 分間放置し，その後 60 % PCA を加えて反応を停止させた．遠心分離後の上清を 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (N-BDF)と 60 °C で 1 分間反応させることで誘導体化させ，LaChromUltra U-HPLC system (日立ハイテク社製)を用いてアミノ酸分析を行った.H 型アミノ酸標準液分析結果を基準にして Z-Phe-Leu-OH の加水分解産物である L-Leu の生成量から各変異体酵素のペプチダーゼ活性を算出した．アニリダーゼ活性は，アニリド基質 BT*p*NA を用いて評価した(21,41)．0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)内で 10~20 μg/ml 酵素液と DMF に溶解した 0.3 mM BT*p*NA 溶液を混合させ, U-2000A 分光光度計(日立社製)により室温で 5 分間 A_{410} をモニタリングした．加水分解産物である *p*-nirtoaniline の生成量から組換え体 CPY のアニリダーゼ活性を算出した.

3.2.2.5. 分子モデリングソフトウェアを用いた構造安定性の評価

各変異体について，変異の導入による構造への影響を *in silico* で検討した．ソフトウェアは Discovery Studio® 2.5.5 (Accelrys 社製)を用い，野生型 CPY（PDB ID: 1YSC）を初期構造に用いた．初めに初期構造の極小化をソフトウェア内の‘Minimization’プロトコルで行った．その際，力場には CHARMm を使用し，RMS Gradient が 0.1 kcal/molÅ 未満となるところを計算終了条件としプロトコルを繰り返した(47)．極小化した初期構造を用いて‘Build Mutants’プロトコルを実行し，目的箇所のアミノ酸を置換した．その後，得られたアミノ酸置換体について‘Minimization’

プロトコルにてさらに極小化を行い，RMS Gradient が 0.1 kcal/molÅ 未満となったところで計算を終了し，変異体タンパク質とした．極小化されたそれぞれの変異体タンパク質の立体構造において，WT との Potential energy，van der Waals energy，Electrostatic energy の差を算出し，分子全体のエネルギー変化を調べた．

3.3. 結果

3.3.1. 蝶番様ジスルフィド結合を形成する Cys の Ala 置換体の発現・精製

メガプライマーを用い部位特異的に *prc1* 配列の目的箇所に DNA 変異を導入し，各変異体の発現ベクターを構築した．DNA シークエンス解析結果から，変異の導入を確認した．作製した各発現ベクターをそれぞれ酵母 BY4741*prc1*Δ 株に導入し，変異体タンパク質を誘導発現させた．回収した菌体を SDS-PAGE 及び Western blot により解析した結果，いずれの変異体 CPY も細胞内に発現していることが確認された(Fig. 3-2 (A))．実験方法に記載の通りに精製を行った結果，C193A 及び C207A については精製段階で凝集することが判明した(Fig. 3-2 (B))．この結果から，この 2 つの変異体は正しくフォールディングされていないことが示唆された．一方，C262A 及び C268A については精製の最終段階まで可溶性タンパク質として回収された．この結果から，ジスルフィド結合 Cys262-Cys268 の開裂は酵素全体の立体構造保持に顕著な影響は及ぼさないことが示唆された．

3.3.2. C262A 及び C268A の酵素活性

可溶性タンパク質として精製された C262A 及び C268A について，Z-Phe-Leu-OH に対するペプチダーゼ活性及び BT*p*NA に対するアニリダーゼ活性を測定した．その結果，C262A 及び C268A の両方において，WT と比較していずれの活性も著しく低下した(Table 3-2)．Cys262-Cys268 の開裂により構造の自由度が増し V 字ヘリックスに揺らぎが生じることが考

えられる．したがって，このことが CPY の触媒活性に影響を及ぼすことが示唆される．

3.3.3. 各変異体の構造安定性

各変異体(C193A，C207A，C262A，C268A)において，変異による立体構造への影響を調べるため，Discovery Studio 2.5.5 を用い，力場 CHARMm に基づきそれぞれの変異体 CPY の Potential energy，van der Waals energy，Electrostatic energy を算出した．その結果，いずれのエネルギーも WT と比較して上昇していることがわかった(Table 3-3)．このことより，それぞれの Cys を Ala に置換することで，WT と比較して立体構造が不安定化することが示唆された．

3.4. 考察

タンパク質はさまざまな結合や相互作用によりその立体構造が安定な状態に保たれているため，そのうち共有結合性であるジスルフィド結合を開裂させると立体構造は自由度が増し，揺らぎが生じる．ジスルフィド結合形成時の天然状態が熱力学的に最安定であるならば，結合の開裂により安定性は低下することが予想される．CPY において，蝶番様ジスルフィド結合(Cys193-Cys207 及び Cys262-Cys268)の開裂によって構造の揺らぎが起こったとき V 字ヘリックスの構造は直接的にその影響を受けると思われる．本章において，蝶番様ジスルフィド結合を形成する Cys 残基を Ala に置換した各変異体のエネルギーが WT と比較して大きく上昇する結果を示した．つまり，これらのジスルフィド結合の形成が CPY の立体構造の安定性に寄与していると言える．実際，C193A 及び C207A はフォールディングに致命的な影響が生じていることから，実験的にも立証された．これらは V 字ヘリックスが CPY の立体構造維持に重要な役割を担うことを示す 1 つの結果である．

また，C262A 及び C268A において触媒活性が著しく減少したことと合わせると，この性質は蝶番様ジスルフィド結合の開裂による V 字ヘリックスの立体構造の揺らぎにより表れたと解釈される．したがって，酵素反応触媒において Cys262-Cys268 の形成は必須であり，V 字ヘリックスが触媒活性においても大きく関与することが立証された．

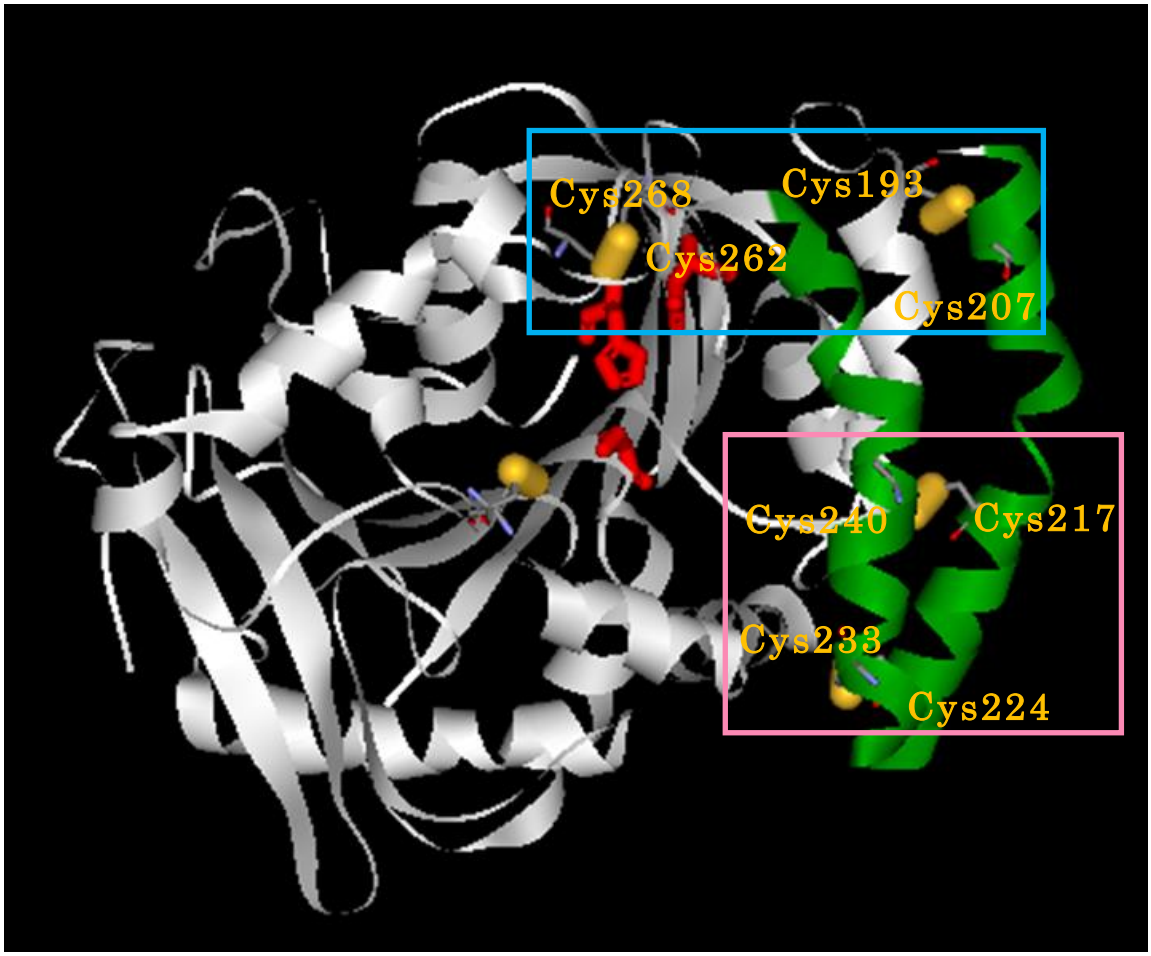


Fig. 3-1 Disulfide bonds in CPY molecule

Four out of five disulfide bonds formed in CPY molecule associate with V-shape helix. Disulfide bonds are shown in orange thick stick. 'Hinge' disulfide bonds (Cys193-Cys207 and Cys262-Cys268) and 'disulfide zipper' (Cys217-Cys240 and Cys224-Cys233) are framed in blue and pink boxes, respectively. V-shape helix is colored in green and catalytic triad is shown in red stick.

Table 3-1 Oligonucleotide primers using for construction of plasmid vectors of mutants (C193A, C207A, C262A, and C268A) by site-directed mutagenesis method

Primers	Sequences
C193A-F	5'-GAACCAATGGCCGCTGGTGAAGGTG-3'
C207A-F	5'-CCCTCGGAGGAAGCCTCTGCTATGGAA-3'
C262A-F	5'-CAGGAAGGATGCTGAAGGTGGCAA-3'
C268A-F	5'-GGTGGCAATTTGGCCTACCCAACGT-3'
prc1-inside-R	5'-CCTTCACAATCCTTCCTGATATC-3'
CYC1Termination	5'-AGGTTGTCTAACTCCTTCC-3'

Each primer was used as the forward primers for mutagenesis of Cys to Ala. The sequence of each forward primer is only shown. Mutation sites are indicated by double-underlines.

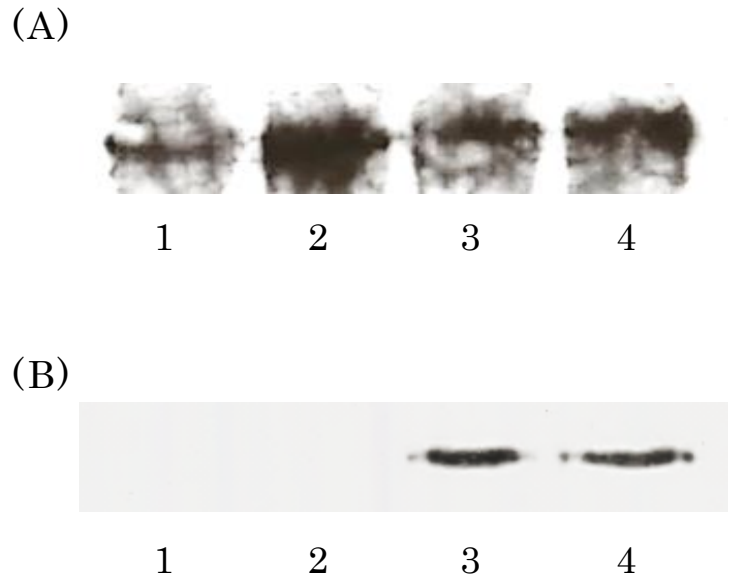


Fig. 3-2 Western blotting of mutants expressed in yeast cells (A) and activated and purified mature mutants (B)

Yeast cells after inducible cultivation were lysed in SDS-PAGE sample buffer and boiled. The supernatant was analyzed by Western blotting. Cell lysate of yeast expressing mutants was fractionated by ammonium sulfate and was subjected to TOYOPEARL Butyl-650M column. The each eluate was analyzed by Western blotting. Rabbit polyclonal anti-CPY antiserum (1:10,000) and horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (1:100,000) were used in Western blotting.

(A) (B) Lane 1, C193A; lane 2, C207A; lane 3, C262A; lane 4, C268A

Table 3-2 Relative specific activity of wild-type and mutant CPYs toward Z-Phe-Leu-OH and BT*p*NA

CPY	Z-Phe-Leu-OH[a]	BT*p*NA[b]
WT	(100)	(100)
C262A	8.5	1.8
C268A	16	1.9

[a] Enzyme reaction was performed with 1 mM Z-Phe-Leu-OH at pH 7.0 at room temperature and the amount of released L-Leu was detected by U-HPLC.

[b] Enzyme reaction was performed with 0.3 mM BT*p*NA at pH 7.0 at room temperature and A_{410} was monitored spectrophotometrically.

Table 3-3 The potential energy, van der Waals energy, and electrostatic energy of wild-type and mutant CPYs

PDB model of WT (PDB ID: 1YSC) was optimized using 'Minimization' protocol with CHARMm force field. Conformation of each mutant was constructed based on the minimized WT model and was optimized. Each energy parameter was calculated based on CHARMm force field.

	Potential energy (kcal/mol)		van der Waals energy (kcal/mol)		Electrostatic energy (kcal/mol)	
	Value	Difference	Value	Difference	Value	Difference
WT	-28483.8	—	-2838.3	—	-29477.5	—
C193A	-27967.0	516.8	-2812.4	25.9	-29056.3	421.2
C207A	-27982.0	501.8	-2821.3	17.0	-29053.3	424.2
C262A	-27976.5	507.3	-2818.8	19.5	-29052.1	425.4
C268A	-28001.3	482.5	-2824.6	13.7	-29066.4	441.1

第 4 章　V 字ヘリックスの先端付近のアミノ酸置換が立体構造及び基質特異性に及ぼす影響

4.1. 緒論

結晶構造を観察すると，V 字ヘリックスは活性中心ポケットを覆うように位置していることがわかる(Fig. 1-2). 基質が活性中心へ進入するためには，V 字ヘリックスは結晶時の状態から動く必要があると思われる．第 3 章の結果より，蝶番様ジスルフィド結合(Cys193-Cys207 及び Cys262-Cys268)の固定が CPY のフォールディング及び触媒活性に重要であることが示されたことから，これらの結合を基点として V 字ヘリックスは動くことが予想される．CPY の属する α/ß hydrolase 型のフォールディングパターンを示す多くのリパーゼにおいて，インサートドメインの一部である lid 構造が活性中心への基質の接触を調節することが報告されている(48-51)．しかし，CPY に関して基質の取り込み時の V 字ヘリックスの挙動についてはこれまで注目されておらず,実際に動くのかどうか,また，動く際はどのような挙動をするのかなど不明な点は多い．また，推定されている基質認識部位(S_1', S_1~S_5 サブサイト)のうち，V 字ヘリックスの一部のアミノ酸残基が S_3 及び S_5 サブサイトに含まれることがわかった(Fig. 4-1)(36)．このことから，V 字ヘリックスは酵素反応時には活性中心に接近し基質認識に関与すると考えられる.

そこで，V 字ヘリックスが基質を取り込む際に何らかの挙動を示すものと仮定し，V 字の先端と活性中心のあるコアドメインとを新規のジスルフ

ィド結合を形成させることでV字ヘリックスの固定化を計画した．ジスルフィド結合を形成させるためには両者のアミノ酸をCysに置換する必要がある．結晶時の立体構造をもとに，両者間で距離の近いアミノ酸残基の組み合わせを Discovery Studio® 2.5.5 上で検討した結果，Tyr225 及び Pro315，また，Gln224 及び Lys314 の 2 組について Cys への置換を行うこととした．本章では，部位特異的変異導入法により実際の Cys 置換体(Y225C，P315C，Y225C/P315C，Q224C，K314C，Q224C/K314C)の作製を試みた．また，置換導入に選択した部位について Cys 以外のアミノ酸に置換した変異体 CPY (Y225A，Y225F，P315S，P315G)を作製し，置換部位の影響について検討した．

4.2. 実験材料及び実験方法

4.2.1. 実験材料

E. coli JM109 株はタカラバイオ社から購入し，*S. cerevisiae* BY4741*prc1*Δ 株は Thermo Fisher Scientific 社から購入した．それぞれの菌体の遺伝子型は Table 2.2 に示した．クローニングベクターpGEM-T Easy Vector は Promega 社から購入し，QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit は Agilent Technologies 社から購入した．Blend Taq 及び *Taq* DNA Polymerase はそれぞれ東洋紡社及び New England Biolabs 社から購入した．各種制限酵素は Roche 社，タカラバイオ社，東洋紡社製のものを使用した．疎水性相互作用クロマトグラフィーに使用した TOYOPEARL Butyl-650M は東ソー社から購入した．Quick Start Bradford Protein Assay Kit は Bio-Rad 社から購入した．合成基質である N-benzoyl-L-tyrosine *p*-nitroanilide (BT*p*NA)は Sigma-Aldrich 社製を使用し，benzyloxycarbonyl-L-phenilalanyl-L-leucine (Z-Phe-Leu-OH)及び benzyloxycarbonyl-L-phenilalanyl-L-proline (Z-Phe-Pro-OH)は Bachem 社製を，また，N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (Ac-Tyr-OEt)はペプチド研究所製を使用した．本実験で使用したオリゴヌクレオチドプライマーは日本バイオサービス社及びオペロンバイオテクノロジー社に合成を依頼した．その他の試薬においては，特に記載のない限り，和光純薬社及びナカライテスク社の特級試薬を用いた．

4.2.2. 実験方法

4.2.2.1. 分子モデリングソフトウェアを用いた変異導入箇所の検討

分子モデリングは Accelrys 社の Discovery Studio® 2.2.5 を用いて行った. 活性中心を含むコアドメインと V 字ヘリックス間で新たにジスルフィド結合を形成させることで V 字ヘリックスを固定化させることを計画した. 両者間でジスルフィド結合を形成させるために, Cys への置換残基を Discovery Studio® 2.5.5 上で検討した. 成熟型 CPY の立体構造（PDB ID: 1YSC）を表示させ, 活性中心を含むコアドメインと V 字ヘリックスを構成するアミノ酸残基の Cβ の距離をモニタリングした. 2 残基間においてアミノ酸残基の側鎖が互いに向き合い, 且つ距離の近い(およそ 6 Å まで)組み合わせを抽出した.

4.2.2.2. Cys 置換体の作製

4.2.2.1.での検討により, Tyr225 及び Pro315, また, Gln224 及び Lys314 の 2 組について Cys への置換を行うこととした. 野生型 CPY の発現ベクター pLTCV5HGWT をテンプレート, Table 4-1 に示すオリゴヌクレオチドプライマーを用い, QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit に従って目的箇所に DNA 変異を導入し, 各変異体(Y225C, P315C, Y225C/P315C, Q224C, K314C, Q224C/K314C)の発現ベクターを作製した. 目的箇所の DNA 変異の導入は DNA シークエンス解析により確認した.

作製したプラスミドベクターを BY4741*prc1*Δ 株へ酢酸リチウム法にて導入し, SD(-ura)プレート培地上で形質転換体をスクリーニングした. 形

質転換体を YPD 液体培地で OD_{600}>1 になるまで 28 °C で振とう培養し，その後 0.5 M NaCl を添加し，20 °C で 3 日間誘導培養した．菌体を回収し，0.2 ml/g wet cell のクロロホルム及び 0.4 ml/g wet cell のミリ Q 水を加え，pH 7.0 を保ち室温で 16 時間撹拌させながら自己溶菌させた．遠心分離後の上清に対して硫安分画を行い，20-90%の画分の沈殿を回収した．3 ml/g ppt の 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)で沈殿を再溶解させ，pH 5.0 を保ちながら室温で 18 時間放置させることで，pro-CPY を成熟化させた．遠心分離後の上清を 5 倍量の 10 mM sodium phosphate buffer, 2 M ammonium sulfate (pH 7.0)と混合し，同 buffer で十分に平衡化させた TOYOPEARL Butyl-650M カラム(1.5 × 5 cm)に通した．10 mM sodium phosphate buffer, 0.1 M ammonium sulfate (pH 7.0)でレジンを洗い，10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)で CPY を溶出させた．溶出液は centricon YM-10 を用いて 2 倍に濃縮させ, 50 °C で 10 分間熱処理させた．遠心分離後の上清を精製酵素液とした．

4.2.2.3. Tyr225 及び Pro315 の置換体の作製

Tyr225 及び Pro315 の置換が CPY にどのような影響を及ぼすかを検証するために，別の置換体(Y225A，Y225F，P315S，P315G)の作製を試みた．各変異体 CPY に対する発現用ベクター pLTCV5HGY225A，pLTCV5HGY225F，pLTCV5HGP315S，pLTCV5HGP315G の構築及び発現・精製は前項に示したものと同様の方法で行った．DNA 変異の導入の際に用いたオリゴヌクレオチドプライマーは Table 4-1 の通りである．

4.2.2.4. タンパク質定量

溶液内のタンパク質量は，bovine serum albumin を標準タンパク質として Quick Start Bradford Protein Assay Kit を用いて定量した．実際の手順はキットの取扱説明書の記述に従った．

4.2.2.5. SDS-PAGE 及び Western blotting

変異体 CPY の発現及び精製段階は SDS-PAGE 及び Western blotting により確認した．実際の手順は 2.2.2.9.に記載の通りである．抗体には，一次抗体に 10,000 倍希釈した Anti-CPY antiserum (本研究室保有品)，二次抗体に 100,000 倍希釈した horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (GE Healthcare 社製)を用いた．化学発光試薬は ImmunoStar LD (和光純薬社製)を用いた．

4.2.2.6. 酵素活性の測定

可溶性タンパク質として精製された変異体 CPY に対して,ペプチダーゼ活性及びアニリダーゼ活性を測定した．10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)内で精製酵素 3.5 µg を 1 mM の Z-Phe-Leu-OH と混合させ，室温で 5 分間放置し，その後 60 % PCA を加えて反応を停止させた．遠心分離後の上清を 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (N-BDF)と 60 °C で 1 分間反応させることで誘導体化させ，LaChromUltra U-HPLC system (日立ハイテク社製)を用いてアミノ酸分析を行った. H 型アミノ酸標準液を基準にして Z-Phe-Leu-OH の加水分解産物である L-Leu の生成量を算出し，各変異体酵素のペプチダーゼ活性を求めた．アニリダーゼ活性は，アニリ

ド基質 BT*p*NA を用いて評価した(21,41). 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)内で 10~20 μg/ml 酵素液と DMF に溶解した 0.3 mM BT*p*NA 溶液を混合させ, U-2000A 分光光度計(日立社製)により室温で 5 分間 A_{410} をモニタリングした. 加水分解産物である *p*-nirtoaniline の生成量から組換え体 CPY のアニリダーゼ活性を算出した.

4.2.2.7. P315G に対する酵素反応速度論的解析

P315G について触媒活性を検証するために, ペプチド基質, アニリド基質, エステル基質に対する酵素反応速度論的解析を行った(19,21). ペプチド基質には Z-Phe-Leu-OH 及び Z-Phe-Pro-OH を用い, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)環境下, 室温で酵素反応を行った. LaChromUltra U-HPLC system (日立ハイテク社製)を用いて N-BDF による誘導体化後の反応液中のアミノ酸を分析し, H 型アミノ酸標準液の分析結果を基準にして酵素反応生成物である L-Leu 及び L-Pro の生成量を算出した. アニリド基質には BT*p*NA を用い, 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)環境下, 室温で酵素反応を行った. 分光光度計により A_{410} をモニタリングし, 反応生成物 *p*-nitroaniline の生成量を算出した. エステル基質には Ac-Tyr-OEt を用い, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)環境下, 室温で酵素反応を行った. 分光光度計により A_{237} をモニタリングし, Ac-Tyr-OEt の分解量を算出した. 各基質に対する速度パラメータ(k_{cat} 値, Km 値, k_{cat}/Km 値)は Michaelis-Menten 式及び Hanes-Woolf plot を用いてそれぞれ算出した.

4.3. 結果

4.3.1. 分子モデリングソフトウェアを用いた変異導入箇所の検討

V 字ヘリックス及びコアドメインのアミノ酸残基間の Cβ の距離を Discovery Studio® 2.5.5 上で算出した結果, Tyr225 及び Pro315 間において 4.5 Å と最短であり, 次いで, Gln228 及び Lys314 間が近距離であり 5.8 Å であった (Fig. 4-2). よって, この 2 つのアミノ酸残基の組み合わせで Cys の導入を実施することとした.

4.3.2. Cys 置換体の発現・精製及び酵素活性

4.3.1.で検討したアミノ酸残基の Cys 置換体の作製を計画した. 新規のジスルフィド結合の形成を目指すため, それぞれの残基の組み合わせについて Cys の二重変異体(Y225C/P315C 及び Q228C/K314C), また, 各残基の Cys 導入による影響を評価するために単一変異体(Y225C, P315C, Q228C, K314C)も同様に作製することにした. それぞれの変異体に対する発現ベクターを部位特異的変異導入法により構築した. DNA シークエンス解析により, 目的部位の DNA 変異がそれぞれ確認された. これらの発現ベクターを用いて酵母を形質転換し, 誘導培養を行った結果, いずれの変異体 CPY も細胞内に発現していることが確認された (Fig. 4-3 (A)). しかし, 精製の結果, Q228C 及び K314C については可溶性タンパク質として精製されたのに対し, 二重変異体(Y225C/P315C 及び Q228C/K314C), Y225C, P315C については精製過程で凝集した(Fig. 4-3 (B)). この結果から, 凝集した変異体 CPY ではフォールディングが正しく行われていなかっ

たことが示唆された．いずれの二重変異体においても凝集したことから，V字ヘリックス上あるいは周辺での過剰なCysの存在がフォールディングに影響を及ぼすことが示唆される．つまり，V字ヘリックス及びコアドメイン間で自主的に新規のジスルフィド結合を形成させることは困難であろうと考えられる．

一方，Q228C及びK314Cについては可溶性タンパク質として精製されたことから，Gln228及びLys314をCysに置換することそのものがフォールディングに影響するわけではないことが考えられる．対して，Y225C及びP315Cはいずれも二重変異体と同様に凝集したことから，Tyr225及びPro315のアミノ酸置換が立体構造を変化させることが示唆される．

4.3.3. Q228C及びK314Cの酵素活性

可溶性タンパク質として精製されたQ228C及びK314Cについて，Z-Phe-Leu-OHに対するペプチダーゼ活性及びBT*p*NAに対するアニリダーゼ活性を測定した．その結果，両変異体とも，いずれの活性もWTと比較してほぼ半減することが判明した(Table 4-2)．この結果から，Gln228及びLys314のCysへの置換は酵素活性に影響を及ぼすことが示唆された．

4.3.4. Tyr225及びPro315のアミノ酸置換の影響

4.3.2.にて，Tyr225及びPro315のCys置換体はいずれも凝集することが判明した．この結果がこれらのアミノ酸が変化したことによるものであるのか，あるいはCysの導入によるものであるのかを調べるために，この2つの残基について他のアミノ酸置換体(Y225A，Y225F，P315S，P315G)

を作製し，影響を検討した．その結果，すべての置換体が酵母内で誘導発現していることが確認されたが，Y225A 及び Y225F は Y225C と同様に凝集することが判明した(Fig. 4-4)．このことから，225 番のアミノ酸が Tyr であることが正しいフォールディングにおいて重要であることが示唆された．一方，P315S 及び P315G は可溶性タンパク質として精製されたことから，P315C の凝集の原因は Cys の導入によるものであることが示唆された．

4.3.5. P315S 及び P315G の酵素活性

可溶性タンパク質として精製された P315S 及び P315G について，Z-Phe-Leu-OH に対するペプチダーゼ活性及び BT*p*NA に対するアニリダーゼ活性を測定した．その結果，P315S においては，WT と比較していずれの活性も半減した．一方，P315G では，ペプチダーゼ活性は半減するのに対し，アニリダーゼ活性の上昇が認められた(Table 4-3)．これらの結果から，Pro315 の置換が酵素活性に影響し，さらに，P315G において基質特異性が変化することが示唆された．

4.3.6. P315G の酵素反応速度論的解析

4.3.5.の結果から，P315G において基質特異性の変化が示唆されたため，ペプチド基質(Z-Phe-Leu-OH 及び Z-Phe-Pro-OH)，アニリド基質(BT*p*NA)，エステル基質(Ac-Tyr-OEt)に対する P315G の酵素反応速度論的解析を行った．その結果，アニリド基質に対しては WT と比較して基質との親和性及び触媒活性について大きな差は見られなかった．一方，ペプチド基質に

対しては，触媒活性(k_{cat}/K_m)の明らかな低下が認められた．これは，分子活性(k_{cat})の低下によるものであった．また，エステル基質に対しても，ペプチド基質と同様に分子活性の低下により，触媒活性が低下した．これらの結果から，P315G において，アニリド基質に対する触媒活性のみ保持されることが示唆された(Table 4-4).

4.4. 考察

RNase A を用いた C. B. Anfinsen らの研究から，活性をもつ天然状態の構造が熱力学的に最安定であることからタンパク質はアンフォールド状態からただ 1 通りの組み合わせの適切なジスルフィド結合を形成し正しくフォールディングすることができることが示された(52)．また，CPY においても，変性状態から活性を保持した CPY の再生が可能であることが報告されており，リフォールディング過程での律速段階であるが成熟領域に 11 個存在する Cys 残基のうち適切な組み合わせで 5 つのジスルフィド結合が形成される(6)．しかし，本章の結果から，V 字ヘリックス上もしくはその近傍にたった 1 つ Cys が増えただけでミスフォールディングが引き起こされることが判明した．さらに，V 字ヘリックス上のアミノ酸残基(Tyr225)に対して Cys 以外のアミノ酸への置換(Tyr→Ala もしくは Phe)によっても同様にフォールディングの致命的な影響が見られた．つまり，Cys によらず V 字ヘリックス上のアミノ酸残基が CPY の立体構造形成に関与することが示され，これは CPY のフォールディングにおける V 字ヘリックス部位の重要性を立証するものである．

CPY の触媒活性に関わる残基ついて，部位特異的変異導入法を用いた研究からこれまで数多く報告されているが，いずれも catalytic triad 付近や S_1’，S_1 サブサイト付近に関する研究が主であった．一方，本章では，V 字構造の先端もしくは近傍という，活性中心とは直接関係しないと思われる残基(Gln228 及び Lys314)が加水分解能に関わることを明らかにした．V 字ヘリックスが活性中心を覆うように位置していること，Gln228 が触媒

活性に関与していること，そして基質認識部位である S_3 及び S_5 サブサイトが V 字構造の一部であることと合わせ，V 字ヘリックスの開閉及び触媒反応への関与についての推測が確からしいものとなったと考える．

タンパク質を構成するアミノ酸について，Pro や Gly は二次構造を壊す傾向の強い残基(secondary structure breaker)として知られており，Pro は主鎖構造の形成を制限し，Gly は側鎖が極小であるため主鎖構造を柔軟にする(53-56)．このことを利用して，不安定なタンパク質において Gly を Pro に置換することで安定化させることがよく試みられる(57-59)．本章では，Pro315 の置換による主鎖構造の揺らぎがフォールディング，酵素活性，基質特異性について CPY 分子にさまざまな影響を及ぼすことが明らかとなった．この置換により生じた揺らぎは，接近する V 字ヘリックスにも何らかの影響を及ぼしていることが推測される．本章で得られた結果を通して，V 字ヘリックス上，もしくは近傍の環境変化がフォールディングや触媒活性などに影響しており，CPY の機能について V 字ヘリックスが重大な関わりをもつことが示された．

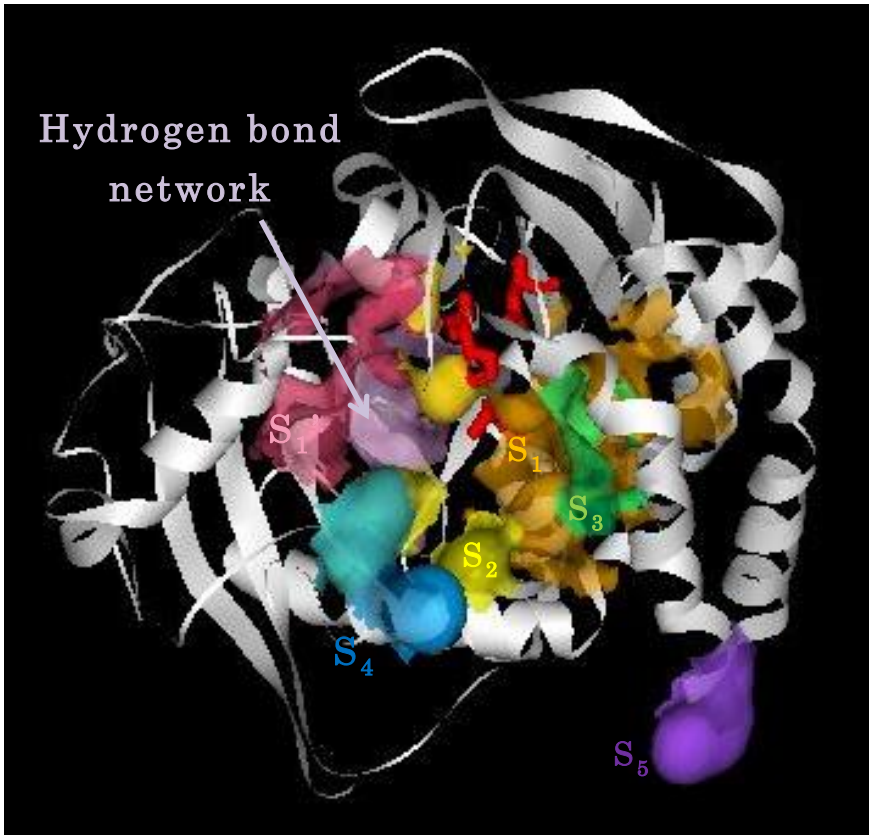
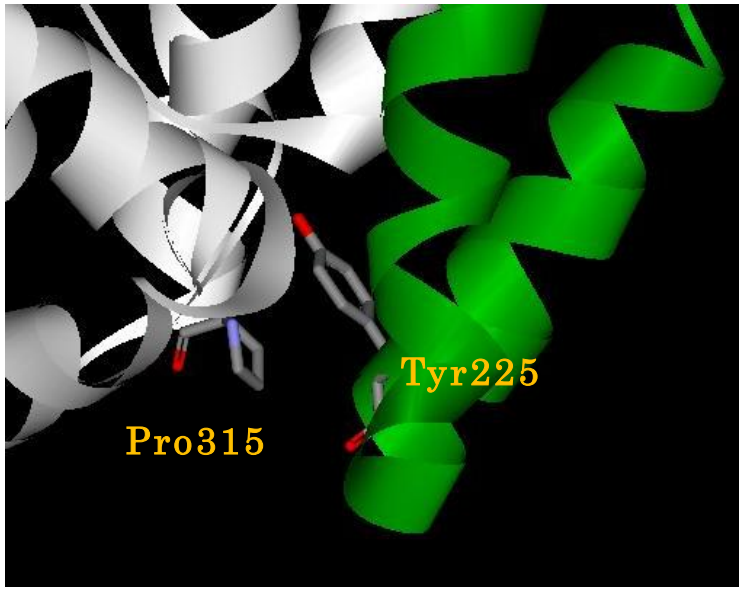


Fig. 4-1 Substrate binding sites of CPY molecule

Substrates are recognized by hydrogen bond network that interacts with the C-terminal carboxylate group, S_1' and S_1 subsites those accommodate amino acid side chains of the substrate, P_1' and P_1, and additional subsites, S_2~S_5. Colored surface of residues that comprise hydrogen bond network and each subsite are shown.

(A)



(B)

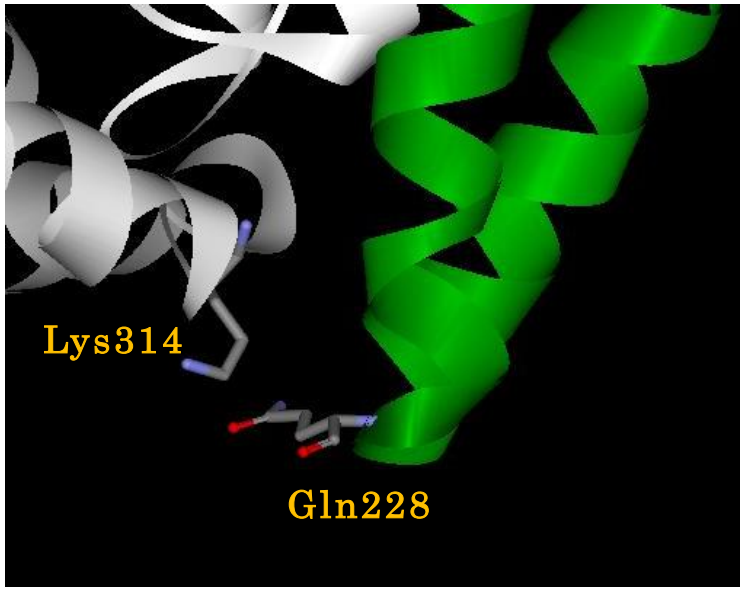


Fig. 4-2 Position of residues replaced by Cys

Two pairs of residues (Tyr225 and Pro315 (A), and Gln228 and Lys314 (B)) were selected for replacement by Cys. The distance of Cβ atoms of Tyr225 and Pro315 was 4.5 Å and that of Gln228 and Lys314 was 5.8 Å. V-shape helix was colored in green.

Table 4-1 Oligonucleotide primers using for construction of plasmid vectors of Cys substituting mutants (Y225C, P315C, Y225C/P315C, Q228C, K314C, and Q228C/K314C) and Tyr225 and Pro315 replaced mutants (Y225A, Y225F, P315S, and P315G) by site-directed mutagenesis method

Primers	Sequences
Y225C-F	5'-TCGAGTCGTGCTGTGACTCGCAATC-3'
P315C-F	5'-GATTGGATGAAGTGTTACCACACCGC-3'
Q228C-F	5'-GTGCTATGACTCGTGCTCCGTCTGGTCC-3'
K314C-F	5'-GGGTGATTGGATGTGTCCTTACCACACCG-3'
Y225A-F	5'-TCGAGTCGTGCGCTGACTCGCAATC-3'
Y225F-F	5'-TCGAGTCGTGCTTTGACTCGCAATC-3'
P315S-F	5'-GATTGGATGAAGTCTTACCACACCGC-3'
P315G-F	5'-GATTGGATGAAGGGTTACCACACCGC-3'

Each primer was used as forward primers for DNA mutagenesis. The sequence of each forward primer is only shown. Mutation sites are indicated by double-underlines.

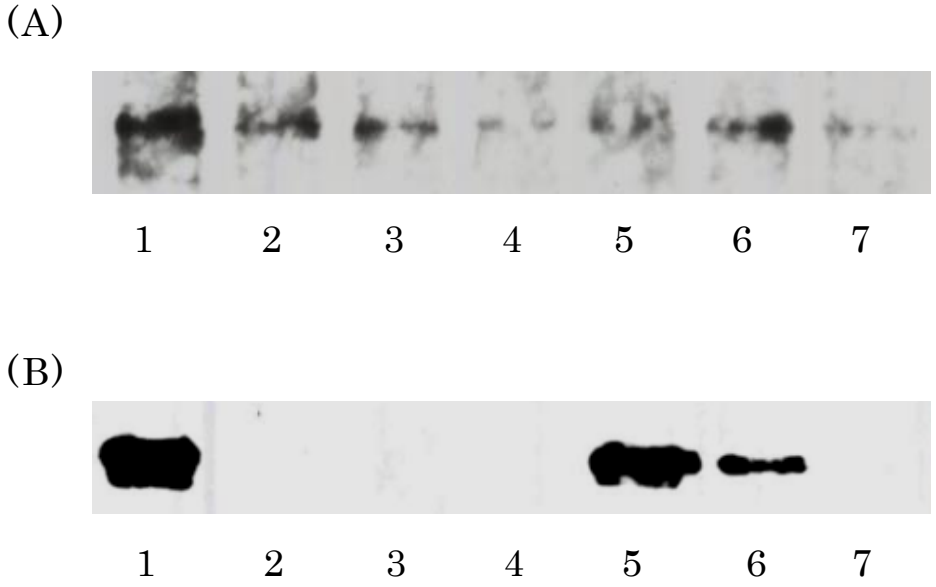


Fig. 4-3 Western blotting of mutant CPYs expressed in yeast cells (A) and activated and purified mature mutant CPYs (B)

Yeast cells after inducible cultivation were lysed in SDS-PAGE sample buffer and boiled. The supernatant was analyzed by Western blotting. Cell lysate of yeast in which mutants were expressed was fractionated by ammonium sulfate and was subjected to TOYOPEARL Butyl-650M column. The each eluate was analyzed by Western blotting. Rabbit polyclonal anti-CPY antiserum (1:10,000) and horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (1:100,000) were used in Western blotting.

(A) (B) Lane 1, WT; lane 2, Y225C; lane 3, P315C; lane 4, Y225C/P315C; lane 5, Q228C; lane 6, K314C; lane 7, Q228C/K314C

Table 4-2 Relative specific activity of WT and soluble mutants (Q228C, K314C) toward Z-Phe-Leu-OH and BT*p*NA

CPY	Z-Phe-Leu-OH[a]	BT*p*NA[b]
WT	(100)	(100)
Q228C	57	65
K314C	33	41

The activities of recombinant WT for each substrate were set as 100% active.

[a] Enzyme reaction was performed with 1 mM Z-Phe-Leu-OH at pH 7.0 at room temperature and the amount of released L-Leu was detected by U-HPLC.

[b] Enzyme reaction was performed with 0.3 mM BT*p*NA at pH 7.0 at room temperature and A_{410} was monitored spectrophotometrically.

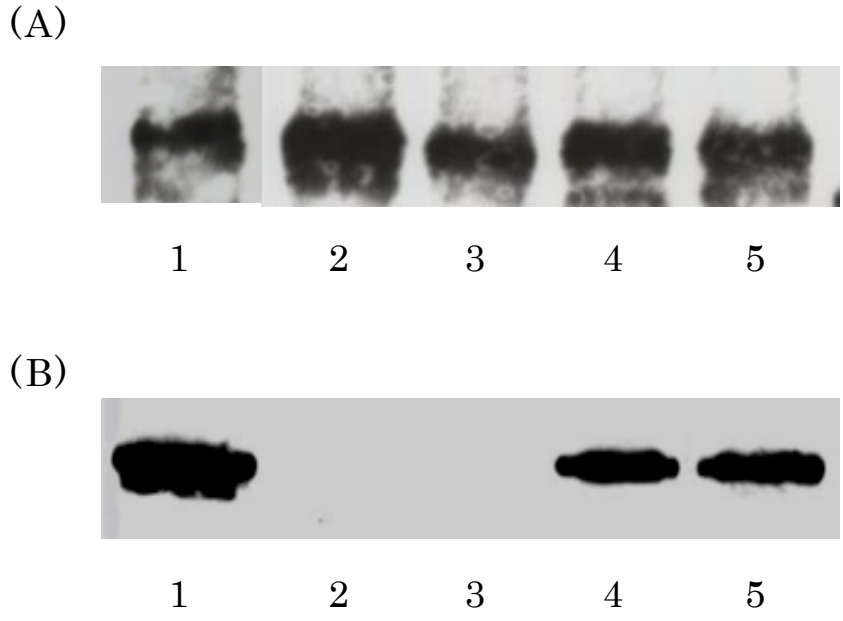


Fig. 4-4 Western blotting of Tyr225 replaced mutants and Pro315 replaced mutants expressed in yeast cells (A) and activated and purified mutants (B)

Yeast cells after inducible cultivation were lysed in SDS-PAGE sample buffer and boiled. The supernatant was analyzed by Western blotting. Auto-lysate of cells expressing mutants was fractionated by ammonium sulfate and was subjected to TOYOPEARL Butyl-650M column. The each eluate was analyzed by Western blotting. Rabbit polyclonal anti-CPY antiserum (1:10,000) and horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (1:100,000) were used in Western blotting.

(A) (B) Lane 1, WT; lane 2, Y225A; lane 3, Y225F; lane 4, P315S; lane 5, P315G

Table 4-3 Relative specific activities of WT and soluble Pro315 replaced mutants (P315S and P315G) toward Z-Phe-Leu-OH and BT*p*NA

CPY	Z-Phe-Leu-OH[a]	BT*p*NA[b]
WT	(100)	(100)
P315S	51	61
P315G	55	170

The activities of recombinant WT for each substrate were set as 100% active.

[a] Enzyme reaction was performed with 1 mM Z-Phe-Leu-OH at pH 7.0 at room temperature and the amount of released L-Leu was detected by U-HPLC.

[b] Enzyme reaction was performed with 0.3 mM BT*p*NA at pH 7.0 at room temperature and A_{410} was monitored spectrophotometrically.

Table 4-4 Kinetic parameters of recombinant wild-type CPY and P315G in the hydrolysis of the dipeptide substrates (A), anilide substrate (B), and ester substrate (C) at room temperature

Each parameter is expressed as mean ± SD calculated from the data of multiple experiments.

(A)

CPY	Z-Phe-Leu-OH			Z-Phe-Pro-OH		
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}\cdot s^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}\cdot s^{-1}$)
WT	15±1	0.067±0.011	230±21	0.54±0.11	0.12±0.08	6.9±3.8
P315G	2.0±0.5	0.019±0.005	100±2	0.21±0.07	0.27±0.23	2.0±1.5

(B)

CPY	BT*p*NA		
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}\cdot s^{-1}$)
WT	0.57±0.04	0.038±0.002	15±0
P315G	0.40±0.05	0.031±0.004	13±2

(C)

CPY	Ac-Tyr-OEt		
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}\cdot s^{-1}$)
WT	160±33	1.8±0.2	90±8
P315G	7.8±5.7	0.39±0.35	36±17

第 5 章　総括

CPY を含めた α/β hydrolase fold 型のタンパク質の立体構造は，活性中心を含むコアドメインとインサートドメインに分けられるが，分類されているタンパク質間において，コアドメインの類似性は高いのに対し，V 字ヘリックスも含まれるインサートドメインについては構造の形態が多様である．つまり，多彩な基質特異性を示す hydrolase 群であるのにも関わらず，酵素の真髄は類似しており，一方で CPY，PPCA，CPWII は同じセリンカルボキシペプチダーゼであるにも関わらず，CPY の V 字構造は他の 2 つに比べて巨大な α ヘリックスで構成されており相同性が著しく低い．リパーゼについてはインサートドメインに関する研究がなされており，基質の接触を調節する機能が提示されているが，そのトリガーについては，溶媒の種類や温度などさまざまである(48,60,61)．ところが，CPY を含めたセリンカルボキシペプチダーゼのインサートドメインについての理解は乏しい．本研究により，V 字ヘリックスに関わるアミノ酸の置換が CPY の触媒活性や構造安定性，フォールディングに影響を及ぼすことが明らかとなり，酵素の根幹ではないインサートドメインが機能的な CPY の構築・維持に関わることが示された．この研究を通して，インサートドメインと α/β hydrolase fold 型のタンパク質におけるフォールディング機構や基質認識機構の多様性に対する新たな洞察が得られることが期待される．

参考文献

1. Hayashi, R., Moore, S., and Stein, W. H. (1973) Carboxypeptidase from yeast. Large scale preparation and the application to COOH-terminal analysis of peptides and proteins. *J. Biol. Chem.* 248, 2296-2302

2. Stevens, T., Esmon, B., and Schekman, R. (1982) Early stages in the yeast secretory pathway are required for transport of carboxypeptidase Y to the vacuole. *Cell* 30, 439-448

3. Kaiser, C. A., Gimeno, R. E., and Shaywitz, D. A. (1997) Protein secretion, membrane biogenesis, and endocytosis. in *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: cell cycle and cell biology* (Pringle, J. R., Broach, J. R., and Jones, E. W. eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY. pp 91-227

4. Holst, B., Bruun, A. W., Kielland-Brandt, M. C., and Winther, J. R. (1996) Competition between folding and glycosylation in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 15, 3538-3546

5. Ramos, C., Winther, J. R., and Kielland-Brandt, M. C. (1994) Requirement of the propeptide for *in vivo* formation of active yeast carboxypeptidase Y. *J. Biol. Chem.* 269, 7006-7012

6. Winther, J. R., and Sørensen, P. (1991) Propeptide of carboxypeptidase Y provides a chaperone-like function as well as inhibition of the enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88,

9330-9334

7. Ballou, L., Hernandez, L. M., Alvarado, E., and Ballou, C. E. (1990) Revision of the oligosaccharide structures of yeast carboxypeptidase Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3368-3372

8. Valls, L. A., Winther, J. R., and Stevens, T. H. (1990) Yeast carboxypeptidase Y vacuolar targeting signal is defined by four propeptide amino acids. *J. Cell. Biol.* 111, 361-368

9. Winther, J. R., Stevens, T. H., and Kielland-Brandt, M. C. (1991) Yeast carboxypeptidase Y requires glycosylation for efficient intracellular transport, but not for vacuolar sorting, in vivo stability, or activity. *Eur. J. Biochem.* 197, 681-689

10. Kakinuma, Y., Ohsumi, Y., and Anraku, Y. (1981) Properties of H^+-translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 256, 10859-10863

11. Sørensen, S. O., van den Hazel, H. B., Kielland-Brandt, M. C., and Winther, J. R. (1994) pH-dependent processing of yeast procarboxypeptidase Y by proteinase A *in vivo* and *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* 220, 19-27

12. Endrizzi, J. A., Breddam, K., and Remington, S. J. (1994) 2.8-Å structure of yeast serine carboxypeptidase. *Biochemistry* 33, 11106-11120

13. Liao, D. I., Breddam, K., Sweet, R. M., Bullock, T., and Remington, S. J. (1992) Refined atomic model of wheat serine

carboxypeptidase II at 2.2-Å resolution. *Biochemistry* 31, 9796-9812

14. Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., and et al. (1992) The α/ß hydrolase fold. *Protein Eng.* 5, 197-211

15. Liao, D. I., and Remington, S. J. (1990) Structure of wheat serine carboxypeptidase II at 3.5-Å resolution. A new class of serine proteinase. *J. Biol. Chem.* 265, 6528-6531

16. Shimizu, H., Ueno, H., and Hayashi, R. (1999) Role of carbohydrate moiety in carboxypeptidase Y: structural study of mutant enzyme lacking carbohydrate moiety. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63, 1045-1050

17. Dumoulin, M., Ueno, H., Hayashi, R., and Balny, C. (1999) Contribution of the carbohydrate moiety to conformational stability of the carboxypeptidase Y high pressure study. *Eur. J. Biochem.* 262, 475-483

18. Hayashi, R., and Hata, T. (1972) Action of yeast proteinase C on synthetic peptides and poly-α ,L-amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* 263, 673-679

19. Hayashi, R., Bai, Y., and Hata, T. (1975) Kinetic studies of carboxypeptidase Y. I. Kinetic parameters for the hydrolysis of synthetic substrates. *J. Biochem.* 77, 69-79

20. Bai, Y., Hayashi, R., and Hata, T. (1975) Kinetic studies of carboxypeptidase Y. III. Action on ester, amide, and anilide substrates

and the effects of some environmental factors. *J. Biochem.* 78, 617-626

21. Hayashi, R. (1976) Carboxypeptidase Y. *Meth. Enzymol.* XLV, 568-587

22. Hayashi, R., Moore, S., and Stein, W. H. (1973) Serine at the active center of yeast carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 248, 8366-8369

23. Hayashi, R., Bai, Y., and Hata, T. (1975) Evidence for an essential histidine in carboxypeptidase Y. Reaction with the chloromethyl ketone derivative of benzyloxycarbonyl-L-phenylalanine. *J. Biol. Chem.* 250, 5221-5226

24. Bech, L. M., and Breddam, K. (1989) Inactivation of carboxypeptidase Y by mutational removal of the putative essential histidyl residue. *Carlsberg Res. Commun.* 54, 165-171

25. Mortensen, U. H., Remington, S. J., and Breddam, K. (1994) Site-directed mutagenesis on (serine) carboxypeptidase Y. A hydrogen bond network stabilizes the transition state by interaction with the C-terminal carboxylate group of the substrate. *Biochemistry* 33, 508-517

26. Sørensen, S. B., Raaschou-Nielsen, M., Mortensen, U. H., Remington, S. J., and Breddam, K. (1995) Site-directed mutagenesis on (serine) carboxypeptidase Y from yeast. The significance of Thr60 and Met398 in hydrolysis and aminolysis reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 5944-5950

27. Breddam, K., and Kanstrup, A. (1987) Cyanylation of the single

sulfhydryl group in carboxypeptidase Y with cyanogen bromide. *Carlsberg Res. Commun.* 52, 65-71

28. Olesen, K., Mortensen, U. H., Aasmul-Olsen, S., Kielland-Brandt, M. C., Remington, S. J., and Breddam, K. (1994) The activity of carboxypeptidase Y toward substrates with basic P_1 amino acid residues is drastically increased by mutational replacement of leucine 178. *Biochemistry* 33, 11121-11126

29. Olesen, K., and Kielland-Brandt, M. C. (1993) Altering substrate preference of carboxypeptidase Y by a novel strategy of mutagenesis eliminating wild type background. *Protein Eng.* 6, 409-415

30. Olesen, K., and Breddam, K. (1995) Increase of the P_1 Lys/Leu substrate preference of carboxypeptidase Y by rational design based on known primary and tertiary structures of serine carboxypeptidases. *Biochemistry* 34, 15689-15699

31. Bai, Y., and Hayashi, R. (1979) Properties of the single sulfhydryl group of carboxypeptidase Y. Effects of alkyl and aromatic mercurials on activities toward various synthetic substrates. *J. Biol. Chem.* 254, 8473-8479

32. Breddam, K., and Svendsen, I. B. (1984) Identification of methionyl and cysteinyl residues in the substrate binding site of carboxypeptidase Y. *Carlsberg Res. Commun.* 49, 639-645

33. Breddam, K. (1983) Modification of the single sulfhydryl group of carboxypeptidase Y with mercurials. Influence on enzyme specificity.

Carlsberg Res. Commun. 48, 9-19

34. Olesen, K., Meldal, M., and Breddam, K. (1996) Extended subsite characterization of carboxypeptidase Y using substrates based on intramolecularly quenched fluorescence. *Protein Pept. Lett.* 3, 67-74

35. Nakase, H., Jung, G., Ueno, H., Hayashi, R., and Harada, Y. (2000) Interaction mode of H397A mutant carboxypeptidase Y with protein substrates analyzed by the surface plasmon resonance. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 73, 2587-2590

36. Nakase, H., Murata, S., Ueno, H., and Hayashi, R. (2001) Substrate recognition mechanism of carboxypeptidase Y. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2465-2471

37. Rudenko, G., Bonten, E., d'Azzo, A., and Hol, W. G. (1995) Three-dimensional structure of the human 'protective protein': structure of the precursor form suggests a complex activation mechanism. *Structure* 3, 1249-1259

38. Sahara, T., Goda, T., and Ohgiya, S. (2002) Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *J. Biol. Chem.* 277, 50015-50021

39. Rose, M. D., Winston, F., and Hieter, P. (1990) *Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

40. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J.*

Bacteriol. 153, 163-168

41. Aibara, S., Hayashi, R., and Hata, T. (1971) Physical and chemical properties of yeast proteinase C. *Agr. Biol. Chem.* 35, 658-666

42. van der Vaart, J. M., Caro, L. H., Chapman, J. W., Klis, F. M., and Verrips, C. T. (1995) Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177, 3104-3110

43. Skrzypek, M., Lester, R. L., and Dickson, R. C. (1997) Suppressor gene analysis reveals an essential role for sphingolipids in transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179, 1513-1520

44. Frieman, M. B., and Cormack, B. P. (2003) The ω-site sequence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae* can determine distribution between the membrane and the cell wall. *Mol. Microbiol.* 50, 883-896

45. Blobel, G. (1980) Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1496-1500

46. Maki, T., Kozawa, H., Mima, J., Ueno, H., and Hayashi, R. (2002) Increased proteolytic susceptibility of carboxypeptidase Y caused by modification of the disulfide zipper. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 1393-1395

47. Momany, F. A., and Rone, R. (1992) Validation of the general purpose QUANTA ®3.2/CHARMm® force field. *J. Comput. Chem.* 13, 888-900

48. Schrag, J. D., and Cygler, M. (1997) Lipases and α/ß hydrolase fold. *Meth. Enzymol.* 284, 85-107

49. Nardini, M., and Dijkstra, B. W. (1999) α/ß hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 732-737

50. Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., Dodson, G. G., Lawson, D. M., Turkenburg, J. P., Bjorkling, F., Huge-Jensen, B., Patkar, S. A., and Thim, L. (1991) A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* 351, 491-494

51. Schrag, J. D., Li, Y. G., Wu, S., and Cygler, M. (1991) Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* 351, 761-764

52. Haber, E., and Anfinsen, C. B. (1962) Side-chain interactions governing the pairing of half-cystine residues in ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 237, 1839-1844

53. Levitt, M. (1978) Conformational preferences of amino acids in globular proteins. *Biochemistry* 17, 4277-4285

54. Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 47, 45-148

55. Aurora, R., and Rose, G. D. (1998) Helix capping. *Protein Sci.* 7, 21-38

56. Colloc'h, N., and Cohen, F. E. (1991) ß-breakers: an aperiodic

secondary structure. *J. Mol. Biol.* 221, 603-613

57. Prajapati, R. S., Das, M., Sreeramulu, S., Sirajuddin, M., Srinivasan, S., Krishnamurthy, V., Ranjani, R., Ramakrishnan, C., and Varadarajan, R. (2007) Thermodynamic effects of proline introduction on protein stability. *Proteins* 66, 480-491

58. Tian, J., Wang, P., Gao, S., Chu, X., Wu, N., and Fan, Y. (2010) Enhanced thermostability of methyl parathion hydrolase from *Ochrobactrum* sp. M231 by rational engineering of a glycine to proline mutation. *FEBS J.* 277, 4901-4908

59. Yasukawa, K., and Inouye, K. (2007) Improving the activity and stability of thermolysin by site-directed mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1774, 1281-1288

60. Barbe, S., Lafaquiere, V., Guieysse, D., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., and Andre, I. (2009) Insights into lid movements of *Burkholderia cepacia* lipase inferred from molecular dynamics simulations. *Proteins* 77, 509-523

61. Abdul Rahman, M. Z., Salleh, A. B., Abdul Rahman, R. N., Abdul Rahman, M. B., Basri, M., and Leow, T. C. (2012) Unlocking the mystery behind the activation phenomenon of T1 lipase: a molecular dynamics simulations approach. *Protein Sci.* 21, 1210-1221

研究業績

I. 原著論文

1. Mai Makino, Takehiko Sahara, Naoki Morita, Hiroshi Ueno
「Amino acid substitution reveals the role of V-shape helix on construction of yeast carboxypeptidase Y」
Journal of Biological Macromolecules (査読有り) (in press)
2. Mai Makino, Takehiko Sahara, Naoki Morita, Hiroshi Ueno
「Expression of carboxypeptidase Y with various signal peptide in yeast」
(Manuscript in preparation)
3. Mai Makino, Takehiko Sahara, Naoki Morita, Hiroshi Ueno
「Effect of disruption of hinge disulfide bonds on function of carboxypeptidase Y」
(Manuscript in preparation)

II. 参考論文

1. 新田 陽子, 寺畑 吏得子, 松葉 直子, 永廣 美代子, 牧野 舞, 吉村 美紀, 佐野 元昭, 尾関健二, 植野洋志
「麹菌グルタミン酸デカルボキシラーゼ遺伝子の発現様式の検討」
ビタミン 86 (9): 508-514 (2012)

III. 国内外学会発表

1. 牧野舞，李藤栄子，中岡寛子，佐々木智子，新田陽子，植野洋志

「酵母カルボキシペプチダーゼ Y に関する酵素学的研究」

日本生物高分子学会 2008 年度大会，京都，2008 年 11 月

2. 牧野舞，李藤栄子，佐々木智子，新田陽子，植野洋志

「組み換え体酵母カルボキシペプチダーゼの発現系の検討」

日本生物高分子学会 2009 年度大会，広島，2009 年 11 月

3. 牧野舞，佐々木智子，李藤栄子，新田陽子，赤桐里美，植野洋志

「酵母カルボキシペプチダーゼ Y の基質取り込み機構の検討」

日本生物高分子学会 2010 年度大会，兵庫，2010 年 9 月

4. 牧野舞，佐々木智子，李藤栄子，新田陽子，植野洋志

「酵母カルボキシペプチダーゼ Y の基質取り込み機構の検討」

第 83 回日本生化学会大会，兵庫，2010 年 12 月

5. 牧野舞，佐々木智子，李藤栄子，佐原健彦，森田直樹，新田陽子，

赤桐里美，植野洋志

「酵母 CPY の V 形ヘリックスの固定による構造と機能の関係の検討」

日本生物高分子学会 2011 年度大会，石川，2011 年 9 月

6. 牧野舞，佐々木智子，李藤栄子，佐原健彦，森田直樹，新田陽子，

赤桐里美，植野洋志

「酵母カルボキシペプチダーゼ Y の立体構造変化による

基質特異性への影響の検討」

第 84 回日本生化学会大会，京都，2011 年 9 月

7. 牧野舞，佐々木智子，佐原健彦，森田直樹，新田陽子，植野洋志
「酵母 CPY のアミノ酸置換による V 形ヘリックス固定化の検討」
日本生物高分子学会 2012 年度大会，秋田，2012 年 9 月

8. 牧野舞，佐原健彦，森田直樹，植野洋志
「酵母カルボキシペプチダーゼ Y の V 形ヘリックスの固定化の検討」
2012 年度日本農芸化学会関西支部大会，京都，2012 年 9 月

9. 牧野舞，佐原健彦，森田直樹，植野洋志
「酵母カルボキシペプチダーゼ Y のアミノ酸置換による基質特異性改変の検討」
第 85 回日本生化学会大会，福岡，2012 年 12 月

10. Mai Makino, Takehiko Sahara, Naoki Morita, Hiroshi Ueno
「Amino acid substitution reveals the role of V-shape helix on substrate specificity of yeast carboxypeptidase Y」
The 27th Annual Symposium of The Protein Society, Boston, MS, USA, July, 2013

11. 植野洋志，中村友美，久木久美子，高橋昌子，伊藤美奈，赤松香奈子，岩堀みね子，牧野舞
「GABA 合成酵素グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD）と食との関係を語る」
食品酵素化学研究会第 13 回学術講演会，大阪，2013 年 9 月

12. 牧野舞，佐原健彦，森田直樹，植野洋志
「酵母 CPY における V 字ヘリックスと基質特異性の関連を探る」
第 86 回日本生化学会大会，神奈川，2013 年 9 月

13. 鈴木理紗，藤田星海，伊藤美奈，牧野舞，植野洋志

「ラット脳由来全長型 GAD65 の酵母発現系における精製の簡便化」

日本生物高分子学会 2013 年度大会，大阪，2013 年 10 月

14. 牧野舞，佐原健彦，森田直樹，植野洋志

「CPY の lid 近傍のアミノ酸置換が基質特異性に与える影響」

日本生物高分子学会 2013 年度大会，大阪，2013 年 10 月

優秀発表賞

IV. 受賞歴

1. 社団法人佐保会奨学金 （平成 22 年 12 月）

2. 奈良女子大学廣部奨学金 （平成 24 年 6 月）

謝辞

稿を終えるにあたり，研究の遂行や論文の執筆などの研究全般に加え研究者としてのノウハウを一からご教授くださり，学部 4 回生のときからの 6 年間，終始温かく懇切にご指導及びご鞭撻くださいました奈良女子大学生活環境学部植野洋志教授に深甚なる感謝と尊敬の意を表します.そして，副指導教員として温かく叱咤激励くださいました奈良女子大学生活環境学部の塚本幾代教授，高村仁知准教授，また，学位論文予備審査において貴重なご助言を頂きました奈良女子大学生活環境学部の小倉裕範教授に心より感謝申し上げます.

本研究を大きく進展させるきっかけとなった，貴重な酵母発現ベクター pLex321sV5H 及びシグナルペプチド挿入ベクター5 種をご提供くださいました，独立行政法人産業技術総合研究所生物プロセス研究部門バイオデザイン研究グループ佐原健彦先生，分子生物工学研究グループ森田直樹先生に心より感謝申し上げます.

また，多くのご助言を与えてくださいました，奈良女子大学赤桐里美助教，岡山県立大学新田陽子准教授を始め日本生物高分子学会に所属されておられる先生方，酵素クラブの先生方，奈良県立医科大学生化学教室高沢伸教授に厚く御礼申し上げます．さらに，学位申請のために共に頑張ってきた奈良女子大学植野研究室の久木久美子さんを始め，共に支え合い切磋琢磨してきた同研究室の大学院生，学部生，卒業生の皆様に厚く御礼申し上げます.

最後に，私に研究者の道を勧め常にいろいろな助言をくれた父，私を気遣い励まし温かく見守ってくれた母，優しく応援してくれた姉に感謝致します.